

# Raster-Kraft-Mikroskopie zur Untersuchung organischer Filme und deren Wechselwirkung mit membranaktiven Substanzen

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Physik

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Herr Dipl.-Phys. Thomas Spangenberg  
geboren am 15.02.1972 in Eberswalde

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Ch. Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Th. Buckhout, PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Niehus
2. Prof. Dr. J.P. Rabe
3. Prof. Dr. B. Klösgen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2007



## **Abstract**

The object of this work was the investigation of organic films and their interaction with membrane active substances by scanning force microscopy. In addition to this objective a scanning force microscope was also developed. The specifications of the device permitted a more detailed investigation of aspects of the mapping process and the direct modification of organic films with the scanning force microscope. As organic films the phospholipids DMPC, DPPC, POPC, PC and mixtures of them were used. These can be considered as model for biological membranes. Mixtures of phospholipids allow the preparation of model membranes which show a gel-liquid-phase separation and which are sufficiently stable for the application to the investigation method. Two different preparation methods – vesicle fusion and solution spreading – were used. The latter method could be adapted for scanning force microscopy in liquids. For the prepared films alterations of the surface due to interaction with peptides and other substances were observed and their influence on the topography of the model surface was time dependently mapped. The observations show that the alterations due to interaction with the peptides starts in the liquid phase regions and propagates over the border regions into the gel-state areas. By means of a computer simulation selected aspects of the investigated peptide interaction could be verified.

## **Keywords:**

AFM, lithography, phospholipids, lipid films, solution spreading, peptides





## **Zusammenfassung**

Der Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung von organischen Filmen und deren Interaktion mit membranaktiven Substanzen mit der Rasterkraftmikroskopie. Begleitend zur Durchführung dieser Aufgabe wurde ein Rasterkraftmikroskop entwickelt, dessen technische Ausführung es gestattete, Aspekte der Abbildung und der gezielten Modifikation organischer Filme mit dem Rasterkraftmikroskop eingehender zu untersuchen. Als organische Filme fanden Phospholipidfilme aus DMPC, DPPC, POPC, PC und Mischungen aus ihnen Verwendung, welche als Modell für biologische Membrane betrachtet werden können. Durch Mischungen der Phospholipide ließen sich Modellmembrane herstellen, welche einerseits für die Untersuchungsmethode ausreichend stabil erwiesen und eine Gel-Flüssigphasenseparation zeigten. Zwei Herstellungsmethoden für die Filme, die Vesikelfusion und eine Technik, welche als „solution spreading“ bekannt ist, wurden angewandt. Die letztgenannte Methode konnte für die in-situ Abbildung mit dem Rasterkraftmikroskop in Flüssigkeiten adaptiert werden. An den hergestellten Lipidfilmen sind Veränderungen der Oberfläche durch die Interaktion mit Peptiden und weiteren Substanzen beobachtet und deren Einfluss auf die Topographie der Modelloberfläche im zeitlichen Verlauf mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet worden. Die Beobachtungen zeigten, dass die Interaktion der verwendeten Peptide zu einer in den flüssigen Regionen des Filmes beginnenden Veränderung führen, welche sich auch von den Rändern her in die Bereiche im Gelzustand fortsetzt. Mit Hilfe einer Simulation konnten ausgewählte Aspekte der untersuchten Wechselwirkung der Peptide mit der Modellmembran nachvollzogen werden.

### **Schlagwörter:**

AFM, Lithographie, Phospholipide, Lipidfilme, Solution Spreading, Peptide



*„Mir hilft der Geist! auf einmal seh ich Rat  
Und schreibe getrost: Im Anfang war die T a t!“*

Goethe

*für Nildete Fatima, meine Frau*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Raster-Kraft-Mikroskopie</b>	<b>3</b>
2.1	Aufbau . . . . .	5
2.1.1	Kraftsensor und Messspitze . . . . .	6
2.1.2	Auslenkungsdetektor . . . . .	7
2.1.3	Anregungssystem . . . . .	8
2.1.4	Steuerung . . . . .	9
2.1.5	Arbeitsmodi . . . . .	11
2.2	Modellbildung . . . . .	13
2.2.1	Annäherung der Messprobe im quasi-statischen Modus	16
2.2.2	Annäherung im dynamischen Modus . . . . .	18
2.3	Betrieb im dynamischen Modus . . . . .	22
2.4	Lithographie . . . . .	25
2.5	technischen Realisation . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Abbildung organischer Oberflächen</b>	<b>31</b>
3.1	Problemstellung der Abbildung mit dem RKM . . . . .	31
3.2	Adhärierte Partikel . . . . .	32
3.2.1	Polymerpartikel . . . . .	33
3.2.2	Solid Lipid Nanoparticle (SLN) . . . . .	34
3.3	Zellen . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Modelloberflächen</b>	<b>39</b>
4.1	Lipidmembranmodelle . . . . .	39
4.2	Das Phospholipid . . . . .	40
4.2.1	Verwendete Phospholipide . . . . .	41
4.2.2	Membrane aus Phospholipiden . . . . .	42
4.2.3	Phospholipidmischungen . . . . .	44
4.3	Methoden der Herstellung der Modelloberfläche . . . . .	44
4.3.1	Vesikelfusion . . . . .	45

4.3.2	Solution Spreading . . . . .	49
4.4	Modell-Lipidlayer durch Solution Spreading . . . . .	55
4.5	Wechselwirkung mit Lipidnanopartikeln . . . . .	59
4.6	Wechselwirkung mit Peptiden . . . . .	61
4.6.1	Modellpeptide . . . . .	61
4.6.2	Wirkung der Modellpeptide auf Modellmembrane . . .	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Insektenauge . . . . .	4
2.2	Aufbau eines RKM . . . . .	6
2.3	Federbalken und Spitze . . . . .	7
2.4	Anregungsvarianten . . . . .	8
2.5	Schwingungsspektren . . . . .	10
2.6	Spitzenform . . . . .	13
2.7	Allgemeine Wechselwirkung . . . . .	14
2.8	Federbalken- und Probenmodell . . . . .	15
2.9	Kraft-Ausdehnungs-Kurve . . . . .	16
2.10	Punktspektren im dynamischen Modus . . . . .	24
2.11	Lithographie einer organischen Oberfläche . . . . .	26
2.12	Ansicht des Raster-Kraft-Mikroskops . . . . .	28
3.1	Polymerpartikel auf Glimmer . . . . .	34
3.2	TM-AFM Abbildung von SLN . . . . .	35
3.3	einzelnes großes SLN . . . . .	36
3.4	Zellen . . . . .	37
4.1	Phospholipid POPC . . . . .	41
4.2	Bilayer auf festem Träger (Schema) . . . . .	43
4.3	Formierung einer Lipidmembran durch Vesikelfusion . . . . .	46
4.4	DMPC Lipidmultilayer an Luft . . . . .	48
4.5	DMPC und DPPC Multilayer hergestellt durch Solution Spreading . . . . .	50
4.6	DPPC/POPC Multilayer hergestellt durch Solution Spreading . . . . .	51
4.7	Hydratation eines DPPC Multilayers . . . . .	52
4.8	DPPC/PC Bilayer in Wasser . . . . .	53
4.9	RKM-Abbildung von DPPC/DOPC in HEPES . . . . .	54
4.10	DPPC/POPC Bilayer in Wasser . . . . .	56
4.11	Lipidmischung auf festem Träger (Schema) . . . . .	57
4.12	DPPC/POPC mit NLC-Suspension . . . . .	60

4.13	DPPC/POPC mit Poloxamer 188 . . . . .	61
4.14	Interaktion von A2P mit einem DPPC/POPC Bilayer . . . . .	64
4.15	Interaktion von KLA1 mit einem DPPC/POPC Bilayer . . . . .	65
4.16	Interaktion von MK5e mit einem DPPC/POPC Bilayer . . . . .	66
4.17	Interaktion von A2P mit einem DPPC Bilayer . . . . .	67
4.18	Modellpeptidwechselwirkung am PC-Bilayer . . . . .	68
4.19	Logischer Ablauf der Simulation . . . . .	70
4.20	Simulation der Interaktion mit einem Bilayer . . . . .	71
4.21	Simulation unterschiedlicher Wirkung . . . . .	73



# Tabellenverzeichnis

4.1	verwendete Phospholipide . . . . .	42
-----	------------------------------------	----



# Kapitel 1

## Zielstellung

Die Raster-Kraft-Mikroskopie [1] hat sich als effektive Methode der Erforschung von Oberflächen in verschiedenen Bereichen der Forschung etabliert und erlaubt topographische Abbildungen bis in den Sub-Nanometerbereich. Aufgrund ihres Funktionsprinzips stellt sie weiterhin die Möglichkeiten bereit, physikalische Eigenschaften auf Nanometerskala zu messen, zu analysieren, zu quantifizieren und Oberflächen einschließlich ausgewählter Objekte darauf zu manipulieren [2, 3, 4, 5]. Die Raster-Kraft-Mikroskopie liefert Informationen, welche auf dieser Skala nur schwer oder gar nicht durch andere Mikroskopieverfahren zu gewinnen sind. Dieses können u.a. viskoelastische [6, 7, 8, 9, 10], magnetische [11, 12] und elektrische Eigenschaften [13, 14, 15, 16] oder auch die Stärke intermolekularer Kräfte, z.B. spezifischer Antikörperwechselwirkungen [17, 18], sein. Damit ergänzt die Raster-Kraft-Mikroskopie andere Mikroskopieverfahren, wie z.B. Rasterelektronen- und Rastertunnelmikroskopie.

Eine Reihe von spezialisierten Arbeitsmodi des Raster-Kraft-Mikroskops wurden entwickelt, welche ihrerseits auch das Potenzial der Methode Raster-Kraft-Mikroskopie dokumentieren. Sie ermöglichen die Abbildung unter den sehr verschiedenen Umgebungsbedingungen in Vakuum, an Luft und in Flüssigkeiten. Gerade wegen dieser Vielseitigkeit fand die Methode u.a. auch eine große Anwendung bei der Untersuchung biologischer Objekte. Hier handelt es sich naturgemäß um vergleichsweise weiche Oberflächen, welche an Luft oder in Flüssigkeiten untersucht werden müssen. Die Komplexität der Systeme oder auch das natürliche Vorkommen (z.B. nicht fixiert an Oberflächen) erfordern häufig eine Modellbildung, bei der einzelne Fragestellungen herausgegriffen und durch die Untersuchung mit dem Raster-Kraft-Mikroskop hinterfragt werden.

Topographische Abbildungen von Objekten unter den Bedingungen an Luft und in Wasser gehören seit vielen Jahren zu den Möglichkeiten der

Arbeit mit dem Raster-Kraft-Mikroskop. Dennoch steht die Interpretation der gewonnenen Messdaten weiterhin im Mittelpunkt verschiedener Untersuchungen, denn das scheinbar einfache Funktionsprinzip des Raster-Kraft-Mikroskops erweist sich wegen der großen Anzahl von möglichen Wechselwirkungen als weiterhin spannend und sehr komplex. Primär liefert die Abbildung mit dem Raster-Kraft-Mikroskop durch eine hohe Zahl von Einzelmessungen eine topographische Information der Kraftwechselwirkung der Messspitze mit dem untersuchten Ausschnitt der Probenoberfläche. Die Dynamik einer Reaktion oder der Interaktion der Oberfläche mit der Umgebung wird in einer Sequenz von Abbildungen durch Änderungen an der Topographie sichtbar. Phaseninformationen in den dynamischen Modi können bei der Interpretation der gewonnenen Abbildungen helfen.

Eine Herausforderung bei der Arbeit an sensiblen Oberflächen ist es, Veränderungen durch den Messprozess zu vermeiden, was durch die Anwendung dynamischer Messmodi realisiert wird. Auf der anderen Seite zeigt sich, dass die exakte Kontrolle des Abbildungsprozesses auch die Chance zu einer neuen Anwendung des Raster-Kraft-Mikroskops, der Lithographie auf Nanometerskala, führen kann.

Der erfolgreiche Einsatz der Raster-Kraft-Mikroskopie bei biologische Fragestellungen [19, 20, 21, 22] und auf künstlichen Membranen macht diese Technik auch für angrenzende Forschungsgebiete mit ähnlichen Fragestellungen interessant.

Ziel der Arbeit ist die Möglichkeiten der Anwendung der Raster-Kraft-Mikroskopie für Fragestellungen in Zusammenhang mit partikulären Trägersystemen (SLN) für Pharmazeutika zu nutzen. Es ist herauszufinden, wie weit die direkte Untersuchung pharmazeutisch relevanter Objekte mit dem Raster-Kraft-Mikroskop andere bereits angewandte Untersuchungsmethoden, wie z.B. die Rasterelektronenmikroskopie, ergänzen.

Ein Raster-Kraft-Mikroskop ist hierfür zu konzipieren und die Abbildungsmethoden sind hinsichtlich der Untersuchungsobjekte zu qualifizieren.

Ein wesentliches Interesse der Arbeit ist es ebenfalls, eine Interaktion pharmazeutisch wirksamer Substanzen an Phospholipidmembranmodellen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop zu verfolgen. Verfahren zur günstigen Bereitstellung von Modellmembranen dafür müssen für den Einsatz in wässriger Umgebung unter den Aspekten der Verfügbarkeit, Stabilität und Wiederholbarkeit getestet werden.

Interaktion dieser Modellmembrane mit Modellpeptiden, Tensiden und SLN sollen visualisiert werden.

# Kapitel 2

## Raster-Kraft-Mikroskopie

Das Raster-Kraft-Mikroskop wurde 1986 durch Binnig, Quate und Gerber erfunden [1]. Die derzeit vorhandenen vielseitigen Möglichkeiten, topographische Abbildungen von Oberflächen unter sehr verschiedenen Umgebungsbedingungen herstellen zu können, sind eine Folge einer dynamischen Entwicklung von auf dem Grundfunktionsprinzip dieses Gerätes basierender Techniken. Modifikationen des Gerätes und des Messablaufs geben die Möglichkeit, neben der topographischen Abbildung auch weitere physikalische Eigenschaften auf Nanometerskala zu messen, zu quantifizieren oder zu verändern. Messgrößen können elektrische Potenzialverteilungen oder magnetische oder viskoelastische Eigenschaften sein. Durch die Eigenschaft des Gerätes, in Vakuum, an Luft und in Flüssigkeiten zu arbeiten, ergeben sich für die Untersuchung von Oberflächen auf der Nanometerskala völlig neue Perspektiven. Prozesse können mit hoher räumlicher Auflösung auf Oberflächen beobachtet werden, wenn durch sie topographische Änderungen verursacht werden oder andere mit dem Mikroskop erfassbare physikalische Eigenschaften modifiziert werden.

Die erzielbare Auflösung dieses Mikroskopieverfahrens hängt von sehr vielen Parametern ab und variiert über einen relativ großen Bereich. Untersuchungsobjekte können lebende Zellen in wässriger Lösung [23] sein, welche gewöhnlich eine Ausdehnung auf der Mikrometerskala haben, genauso wie Oberflächen von Kristallen, welche unter bestimmten Voraussetzungen in atomarer Auflösung [24, 25, 26, 27] abgebildet werden.

Das gleiche Gerät hat im Verlauf der Zeit je nach überwiegender Betrachtungsart unterschiedliche Bezeichnungen erhalten. Sowohl Raster-Kraft-Mikroskop, Atom-Kraft-Mikroskop als auch Kraft-Mikroskop einschließlich ihrer englischsprachigen Komplemente sind gebräuchlich. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung *Raster-Kraft-Mikroskop* und die Abkürzung *RKM* gebraucht.

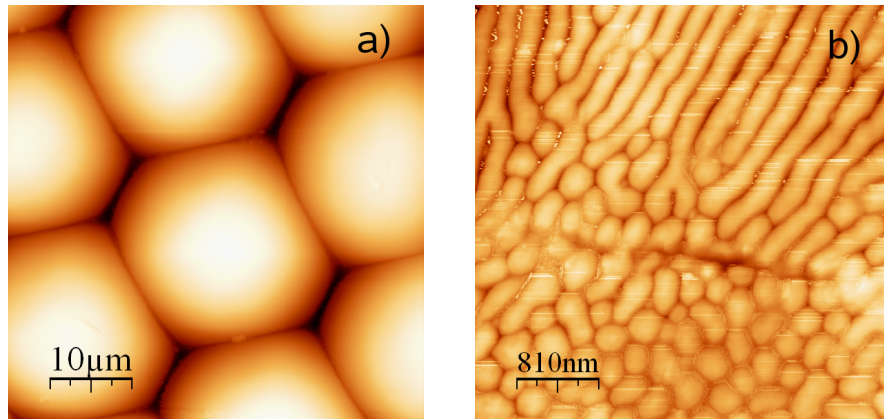


Abbildung 2.1: Topographische Abbildung eines Ausschnittes eines Insektenauges (Fliege) mit dem Raster-Kraft-Mikroskop im dynamischen Modus an Luft. Die linke Abbildung stellt einige Facetten des Auges dar und besitzt eine Kantenlänge von  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Die Höhenskale reicht über  $5\text{ }\mu\text{m}$ . Auf der rechten Seite ist ein Zoom mit einer Kantenlänge von  $4,1\text{ }\mu\text{m}$  in eine der Facetten dargestellt.

Die grundlegende Funktion des Gerätes ist die Messung von Kräften zwischen einer Messspitze als Sonde und der Oberfläche der Probe. Die Messspitze, oder in Zukunft auch nur Spitze genannt, ist dabei an einen Federbalken montiert. Die Dimensionen der Spitze und des Federbalkens sind so gefertigt, dass interatomare und intermolekulare Kräfte gemessen werden können. Die dabei gemessenen Kräfte liegen hierbei häufig im Pico- und Nanonewtonbereich. Mit Hilfe einer Positionierungseinrichtung kann die Spitze relativ zur Probe in alle 3 Raumrichtungen in Sub-Nanometerauflösung positioniert werden.

Seit der Erfindung des Raster-Kraft-Mikroskops haben sich auf der Basis des grundlegenden Funktionsprinzips eine Reihe von unterschiedlichen Betriebsmodi des Gerätes etabliert, die sich u.a. dahingehend unterscheiden, in welcher Weise die Spitze über der Probe geführt wird. Beschichtungen der Spitze können diese auch für zusätzliche Wechselwirkungskräfte (z.B. elektrische oder magnetische) sensibilisieren. In den folgenden Abschnitten soll der Mikroskopaufbau und die für diese Arbeit benutzten Messmodi dargestellt werden. Unterscheiden kann man zunächst Modi, welche einen Scan über eine Fläche ausführen und dabei in bestimmter Weise an vordefinierten Punkten Messwerte sammeln und Modi, bei welchen eher Messdaten an einer Stelle der Probe gesammelt werden. Eine solche Unterteilung würde grob zu Flächenscans und Punkt- oder Spektroskopiemodi führen. Eine Mischung stellen der „touch-and-lift-Modus“ [28] und der Adhäsionsmodus [29]

dar. Wird der Federbalken während der Messungen zu Oszillationen angeregt, so kann man eine Unterteilung in dynamische (mit Oszillation) und quasi-statische (ohne beabsichtigte Oszillation) Messmodi vornehmen. Diese Einteilung ist nicht für alle existierenden Messmodi erschöpfend, aber ermöglicht die Unterteilung der für die in den Experimenten zur Anwendung gekommenen Messmodi.

Eine theoretische Beschreibung der Messmodi ermöglicht erhaltene Messergebnisse einzuordnen. Eine solche Beschreibung muss viele technische Details berücksichtigen und ebenfalls die lokale Kraftwechselwirkung mit einbeziehen. Vieles dabei kann im regulären Messbetrieb nicht ständig qualifiziert und quantifiziert werden. Modelle helfen, Messprozesse zu optimieren und erhaltene Messdaten zu interpretieren.

## 2.1 Aufbau

Der schematische Aufbau eines Raster-Kraft-Mikroskops, welcher eine Beschreibung der Funktionsweise des Gerätes für Abbildungen an Luft und in Flüssigkeiten ermöglicht, ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Die Grundkomponenten des Gerätes sind: der Kraftsensor (*a*) mit der daran befestigten Messspitze (kurz: Spitze), das Positionierungssystem (*c*) welches relative Bewegungen zwischen Probe (*b*) und Spitze in alle 3 Raumrichtungen ermöglicht und ein Auslenkungsdetektor (*d*). Ein Probenhalter ist zur Befestigung des Untersuchungsobjektes (*b*) vorgesehen. Einige Messmodi benötigen ein Anregungssystem für Oszillationen des Federbalkens. Dieses wird durch einen Vibrationspiezo oder durch ein oszillierendes externes Magnetfeld in Verbindung mit einer magnetischen Beschichtung des Federbalkens realisiert. Diese beiden Elemente sind hier nicht abgebildet. Der Vibrationspiezo befindet sich am Befestigungspunkt des Federbalken-Chip während eine magnetische Beschichtung durch den Hersteller des Federbalkens auf der Rückseite des Federbalkens aufgebracht wird.

Dieser schematische Aufbau in Abbildung 2.2 ist ausreichend, um in einem Modell eine Erklärung der Funktionsweise des Gerätes (Abschnitt 2.1.5 ff.) unabhängig der vielen technischen Details zu geben. In die technische Realisation fließen noch eine Anzahl weiterer Aspekte, wie z.B. die Messumgebung, die Probengröße und -material und auch die verfügbare Mess- und Regeltechnik, ein.

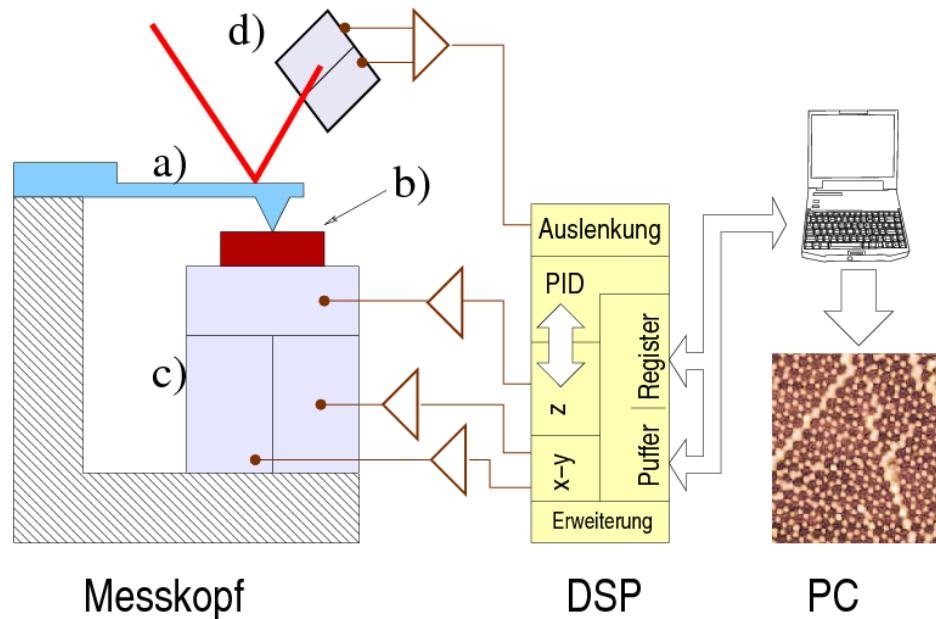


Abbildung 2.2: Der schematische Aufbau eines Raster-Kraft-Mikroskops in einer typischen Zusammenstellung aus Messkopf, DSP und Messwerterfassungscomputer. Die Beschriftung am Messkopf zeigt die Messspitze (a), die Probe (b), das Positionierungs- (c) und das Auslenkungsdetektionssystem (d). In diesem Schema angedeutet sind ebenfalls notwendige elektronische Schaltungen für die Adaption von Signalen zwischen Messkopf und DSP. Der Computer (PC) dient der Kontrolle durch den Operator und ebenfalls der Datensammlung und Darstellung. Durch Erweiterungen im DSP lassen sich nutzerdefinierte Experimente gestalten, welche über die Standardfunktion hinausgehen.

### 2.1.1 Kraftsensor und Messspitze

Der Kraftsensor mit daran montierter Messspitze ist ein wesentlicher Bestandteil eines Raster-Kraft-Mikroskops. Die Abbildung 2.3 zeigt einen Federbalken in einer Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme. Neben den Dimensionen eines Federbalkens und einer Spitze zeigt die Abbildung auch einen Teil des Chipträgers, an welchem die Federbalken gefertigt werden.

Diese Chipträger dienen neben der Halterung des Federbalkens auch der Montage des Federbalkensensors im RKM.

Die Spitze befindet sich am Ende des Federbalkens und stellt dabei die Sonde dar, deren Wechselwirkungskräfte mit der Probe gemessen werden sollen. Offensichtlich ist, dass die Dimension und die Geometrie der Spitze eine Rolle bei der möglichen Ortsauflösung des RKM spielt. Das Material



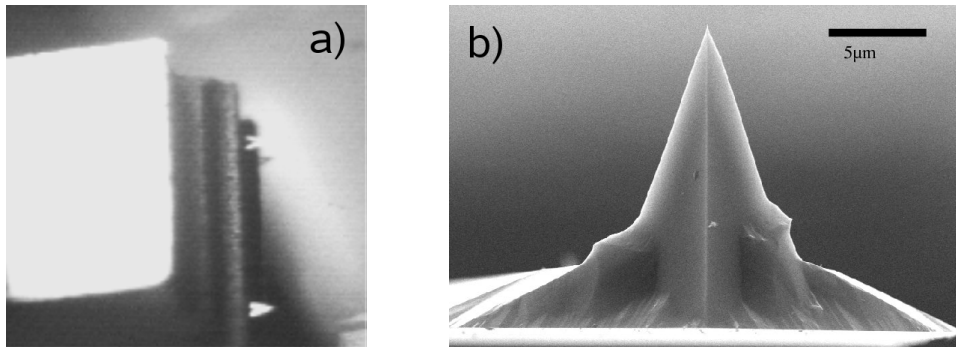


Abbildung 2.3: a) Lichtmikroskopabbildung eines RKM Federbalkens in dreieckiger Ausführung mit Chipträger. Chipträger und Federbalken sind aus  $\text{Si}_3\text{N}_4$  gefertigt und rückseitig mit Gold als Reflektor beschichtet. b) REM<sup>†</sup>-Abbildung einer Spitze eines Si Federbalkens. In der REM-Abbildung entspricht der Balken einer Länge von  $5\mu\text{m}$ .

der Spitze entscheidet mit darüber, welche Wechselwirkungskräfte gemessen werden können.

Als Kraftsensoren/Messspitzen (AFM-cantilever) kamen verschiedene kommerziell erhältliche Federbalken aus unterschiedlichen Materialien und in unterschiedlichen Geometrien zur Anwendung, wodurch eine Anpassung an Anforderungen (Federkonstante, Resonanzfrequenz) des Experiments gewährleistet war.

### 2.1.2 Auslenkungsdetektor

Die Kraftwechselwirkung zwischen der Spitze und der Probenoberfläche wird beim Raster-Kraft-Mikroskop mit Hilfe des Federbalkens gemessen. Im Fall quasi-statischer Messungen, wie z.B. Kraft-Distanz- oder Kontakt-Modus-Messungen, wird durch die auftretenden Wechselwirkungskräfte der Federbalken aus seiner Ruhelage ausgelenkt. Die quasi-statische Auslenkung selber gibt für das Experiment eine wesentliche Information.

Im Fall des dynamischen Betriebes wird der Federbalken zu Oszillationen in oder in der Nähe seiner Resonanz angeregt. Die Wechselwirkung der Spitze mit der Probe wird das Schwingungsverhalten des Federbalkens verändern. Für diese Art des Betriebes ist die Auslenkung des Federbalkens eine in der Anregungsfrequenz zeitlich veränderliche Größe, aus der eine nachgeordnete Lock-In Elektronik die Amplitude und die relative Phase der Oszillation zum Anregungssignal ermitteln muss. Die Amplitude und die Phase dieser

---

<sup>†</sup>REM-Abbildung durch S. Rogaschewski, HU-Berlin

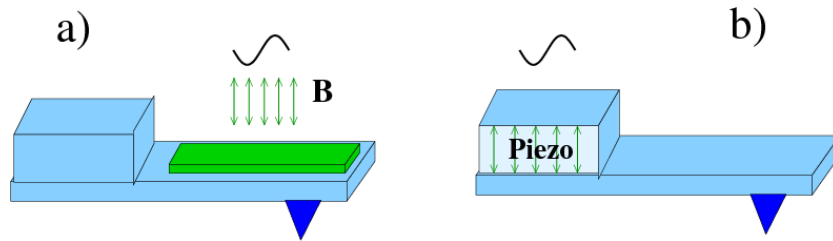


Abbildung 2.4: Die zwei verwendeten Anregungsmechanismen im Vergleich. Links ist schematisch die Anregung durch ein externes wechsellndes Magnetfeld dargestellt, welches mit der auf der Rückseite des Federbalkens aufgetragenen magnetischen Schicht interagiert. Rechts ist schematisch die Vibrationsanregung gezeigt. Am Befestigungspunkt des Federbalkens ist ein Vibrationspiezo angebracht.

Oszillation des Federbalkens werden zu einer wesentlichen Information des Experiments.

In beiden Betriebsmodi muss die relative Auslenkung des Federbalkens zur Ruheposition gemessen und weiterverarbeitet werden. Realisiert wurde das durch ein Lichtzeiger-Detektions-System. Die Anordnung ist so gestaltet, dass der Federbalken durch einen Lichtstrahl in der Art angeleuchtet wird, dass der durch den Federbalken reflektierte Strahl auf eine segmentierte Fotodiode gelenkt wird. Eine Auslenkung des Federbalkens führt damit zu einer dann messbaren Positionsänderung des Leuchtflecks auf der Fotodiode. Die Fotodiode ist relativ zur Ruhelage des Federbalkens fixiert. Das elektronisch gebildete Differenzsignal aus den Segmenten der Fotodiode gibt damit direkt eine Messgröße für die Auslenkung des Federbalkens. Eine Messung der absoluten Position des Federbalkens gegenüber der Probe ist mit einer solchen Anordnung nicht möglich.

### 2.1.3 Anregungssystem

In verschiedenen dynamischen Messmodi [30, 31, 32] werden Schwingungseigenschaften des Federbalkens für Messungen benutzt. Da der Federbalken gedämpfte Schwingungen ausführt, ist eine kontinuierliche externe Anregung notwendig. Die Gestaltung des Anregungssystems, welches aus einer externen Elektronik und einer Einkopplungsvorrichtung am Federbalken besteht, hängt von den beabsichtigten Betriebsbedingungen ab. Es wurden zwei verschiedene Systeme für den Betrieb an Luft und in Flüssigkeiten implementiert.

Eine Anregung des Federbalkens an Luft kann durch einen Vibrations-

piezo am Aufhängepunkt bewirkt werden. Durch den Vibrationspiezo wird der Aufhängepunkt des Federbalkens periodisch um den Ruhepunkt bewegt. In Abschnitt 2.2 wird gezeigt, dass dies im Modell einer periodisch einwirkenden externen Kraft an der Spitze des Federbalkens gleichkommt. Verfügt der Federbalken über eine magnetische Beschichtung, kann auch ein äußeres, zeitlich variierendes Magnetfeld zur Anregung einer Schwingung benutzt werden. Dieses Magnetfeld wird durch eine Spule mit Ferritkern unterhalb der Probe erzeugt und wechselwirkt direkt mit der Beschichtung und erzeugt damit eine direkte periodische Kraft an der Spitze des Federbalkens. Ein Betrieb eines RKM im dynamischen Modus über eine Anregung durch ein wechselndes Magnetfeld [30, 33] wird als „MAC-mode“<sup>‡</sup> bezeichnet. Ein Betrieb in diesem Modus ist vorteilhaft für Messungen in Flüssigkeiten, da die piezomechanische Vibrationsanregung dort eine große Zahl von Scheinresonanzen erzeugt [34, 35, 36, 37].

Die Abbildung 2.5 zeigt im Vergleich drei unter verschiedenen Bedingungen gewonnene Schwingungsspektren von Federbalken. Das rechte Spektrum 2.5a) wurde durch eine Vibrationsanregung in Luft erhalten. Typisch für eine derartige Situation ist das Auftreten einer stark ausgeprägten Resonanz; hier bei 330 kHz. Die mittlere Grafik 2.5b) zeigt ein Spektrum, welches durch Vibrationsanregung in Wasser hergestellt wurde. Typisch für derartige Spektren ist der „Wald von Resonanzen“, einer Vielzahl von scheinbaren Resonanzen, welche für eine Abbildung nicht nutzbar sind. Eine magnetische Anregung 2.5c) hebt dieses Problem auf und zeigt eine für die Schwingung in Wasser typische Resonanz mit einer großen Resonanzbreite bei im Vergleich zu Luft kleineren Frequenzen [38].

Beim dynamischen Betrieb an Luft oder in Flüssigkeiten wird der Federbalken durch einen externen Frequenzgenerator bei einer festen Frequenz angeregt, die in der Regel in der Nähe der Eigenfrequenz des Federbalkens liegt. Eine Diskussion der benutzten Messmodi erfolgt in Abschnitt 2.2.2 und 2.3.

#### 2.1.4 Steuerung

Die Steuerung ist ein weiteres zentrales Element in der Funktion eines Raster-Kraft-Mikroskops, welches entscheidend die Anwendungsmöglichkeiten des Aufbaus beeinflusst. Raster-Kraft-Mikroskopische Abbildungen entstehen durch eine Zusammensetzung einer großen Zahl von Einzelmessungen am Computer. Die zeitliche und räumliche Koordination dieser Messungen übernimmt die Steuerung, welche wie im verwendeten Fall als selbststän-

---

<sup>‡</sup>kommerziell verwendeter Begriff durch die Firma Molecular Imaging

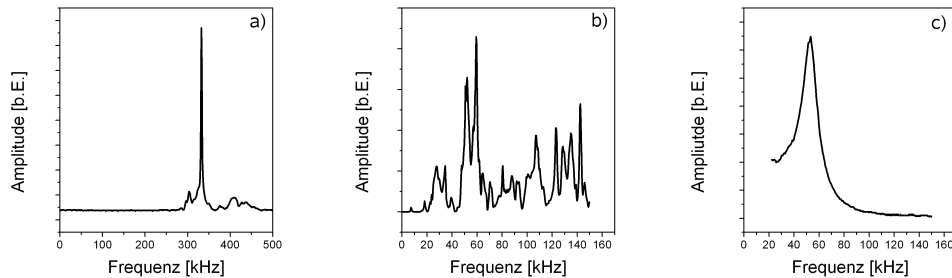


Abbildung 2.5: Schwingungsspektren von Federbalken an Luft a) und in Wasser (b,c), wie sie für fremdangeregte Federbalken gemessen werden. a) Ein solches Spektrum ist für den Fall einer Vibrationsanregung in Luft typisch. Das Spektrum b) ist ebenfalls ein Beispiel für eine Vibrationsanregung; jedoch diesmal in Wasser. Die Anregung durch ein externes Magnetfeld in Wasser führt auf das Spektrum c).

dig funktionierendes DSP-System<sup>§</sup> ausgelegt sein kann. Solche DSP-Systeme sind spezielle auf schnelle digitale Signalverarbeitung ausgelegte Prozessoreinheiten. Analoge oder digitale Eingangssignale werden programmgesteuert mit hoher Geschwindigkeit ausgewertet und es werden digitale oder analoge Werte als Stellgröße wieder ausgegeben.

Die komplette Funktion eines RKM wird durch den Programmcode dargestellt. Dieser Programmcode entscheidet im Zusammenhang mit der externen Beschaltung, welche Messwerte zu welcher Zeit gewonnen werden – oder anders gesagt, in welchem Arbeitsmodus das RKM gerade arbeitet. Die anfallenden Messwerte werden gepuffert und asynchron an den Bediencomputer übertragen, gespeichert und dort visualisiert. Die Abbildung 2.2 auf Seite 6 zeigt ein Schema einer DSP-Steuerung.

Für die nachfolgenden Kapitel sei angemerkt, dass die Steuerung eines RKM auch mindestens einen zuschaltbaren Regelmechanismus enthält, der versucht, eine Eingangsgröße über eine Stellgröße konstant zu halten. Ein solcher Regler ist oftmals als PID-Regler ausgeführt; alternativ gibt es auch andere Ansätze (z.B. eine Fuzzy-Regelung [39]). „PID“ wird von der Tatsache abgeleitet, dass diese Regler das Stellsignal aus dem **p**roportionalen, **i**ntegralen und **d**ifferenziellen Fehler des Eingangssignals im Vergleich zum Sollwert ableiten. In den meisten Flächenscanmodi (s.u.) wird die Eingangsgröße (Auslenkung oder Amplitude) mittels der z-Ausdehnung des Piezos (Stellgröße) auf den Sollwert (Setpoint) reguliert.

---

<sup>§</sup>engl.: **d**igital **s**ignal **p**rocessor

### 2.1.5 Arbeitsmodi

Der Ablauf der durchgeführten Experimente mit dem RKM lässt sich durch sechs wesentliche Messabläufe – oder Messmodi – beschreiben. Zwei davon benutzen zur Gewinnung von Messdaten die quasi-statische Auslenkung des Federbalkens. In den anderen Modi werden Schwingungseigenschaften des Federbalkens, seine Amplitude und seine Phase relativ zur externen Anregung gemessen.

#### Punkt- oder Spektroskopiemodi

Die Kenntnis der Abstandsabhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen Messspitze und Probenoberfläche an einem Ort der Probenoberfläche sind für alle Experimente mit dem Raster-Kraft-Mikroskop von zentralem Interesse. Messungen dieser Art können eigenständige Experimente sein [40, 41, 42] oder sie dienen der Vorbereitung für Flächenscans. Im quasi-statischen Fall wird diese Messung Kraft-Abstands- oder Kraft-Ausdehnungs-Kurve (engl.: force distance curve) genannt. Das Äquivalent im dynamischen Fall ist die dynamische Kraftkurve (engl.: dynamic force curve). Eine Betrachtung dieser beiden Basisexperimente in einem Modell ermöglicht das Verständnis der Arbeitsweise des RKM, die Auswertung experimentell gewonnener Daten und eine Optimierung des Abbildungsprozesses.

Der grundsätzliche Ablauf einer Messung ist für quasi-statische und dynamische Modi ähnlich. Die Messspitze wird der Probe angenähert oder von ihr entfernt, während gleichzeitig die Auslenkung des Federbalkens oder die Veränderung der Schwingungsamplitude und Phase des Federbalkens durch die Wechselwirkung mit der Probe gemessen wird.

Für Experimente im dynamischen Modus spielt die Abhängigkeit der Oszillationsamplitude des Federbalkens von der Antriebsfrequenz eine entscheidende Rolle. Die Eigenfrequenz muss vor vielen Experimenten ermittelt werden und auch die erhaltenen Spektren können wesentliche Informationen über die Interaktion der Messspitze mit der Probenoberfläche enthalten. Zur Bestimmung der Eigenresonanz der Federbalken werden die Spektren weit entfernt von der Probenoberfläche gemessen. Werden die Spektren ihrerseits in Abhängigkeit vom Abstand zur Probenoberfläche gemessen, können sie wichtige Informationen zur lokalen Wechselwirkung liefern [43].

#### Flächenscans

Bei einem Flächenscan wird die Messspitze über einen rechteckigen Ausschnitt der Probenoberfläche bewegt. Dabei werden  $n$  Zeilen angefahren, in denen jeweils an  $m$  Punkten ein oder mehrere Messwerte bestimmt werden.

Die Fahrgeschwindigkeit und die Scanweite, also indirekt die Messpunktdichte, sind in erster Näherung frei wählbar. Ein Parameter kann während der Messung durch den Regelmechanismus der Steuerung auf einem Wert konstant gehalten werden. Um dieses bei sich während des Scans ändernder Probenhöhe zu gewährleisten, wird die Steuerung dafür sorgen, dass die z-Position der Probe über das Positionierungssystem fortwährend nachgeregelt wird.

Eine Darstellung der z-Positionen über die  $n \times m$  Punkte ergibt eine Topographieabbildung. Typischerweise werden, je nach ausgewähltem Modus, an den Messpunkten weitere Messwerte bestimmt, welche neben der Topographie weitere Proben- und Wechselwirkungseigenschaften repräsentieren.

Zwei der wesentlichen Messmodi werden kurz vorgestellt.

**Kontakt-Modus** Eine der ältesten Varianten des Flächenscans ist die Kontakt-Modus-Messung, bei der entweder die Auflagekraft oder der Abstand der Probe konstant gehalten wird. Die erste Variante wurde für Abbildungen im Rahmen dieser Arbeit genutzt. Bei einer Messung im Kontakt-Modus wird eine Spitze im ständigen Kontakt mit der Probe über die zu scannende Fläche gerastert.

Dabei wird an jedem Punkt des Bewegungspfades der Spitze eine Kraft auf die Probe ausgeübt. Da die Spitze an keinem Ort von der Oberfläche abgehoben wird, kommen zusätzlich laterale Kräfte durch die Reibung der Spitze hinzu. Durch eine geeignete Wahl des Federbalkens und der Auflagekraft (Setpoint) kann eine Veränderung der Probe häufig gering gehalten oder vermieden werden. Für sehr weiche Oberflächen (z.B. Lipidfilme) oder Oberflächen mit lose anhaftenden Partikeln (SLN) ist diese Methode wegen der Gefahr einer Modifikation des Messobjektes nur bedingt geeignet. [44, 45, 30, 46]

Ein Vorteil dieser Methode ist jedoch der vergleichsweise einfache Aufbau und die Möglichkeit, eben diese lateralen Kräfte messen zu können.

**Dynamische Modi** In dynamischen Messmodi werden Änderungen der Schwingungseigenschaften des Federbalkens für die Messung der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe und für die Regelung benutzt. Bei Messungen an Luft und in Flüssigkeiten werden als wesentliche Schwingungseigenschaften die Amplitude und die Phase der angeregten Federbalkenschwingung gemessen. Die Amplitude des Federbalkens in der Nähe seiner Eigenresonanz stellt sich dabei als eine z-abhängige Größe dar, welche zur Abstandsregelung während des Scans benutzt werden kann. Scans dieser Art werden in „non-contact“ (NC-AFM) und „Tapping-“ oder „intermittent-contact-mode“ (TM-AFM) unterschieden. Der letztere Modus zeichnet sich dadurch aus,

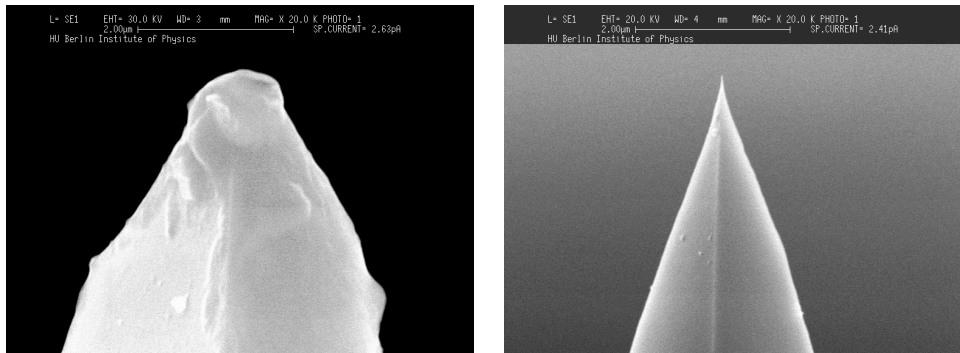


Abbildung 2.6: Rasterelektronenmikroskop-Abbildungen von Spitzen. Die linke Abbildung stellt eine durch den Gebrauch beschädigte und stark verschmutzte Spitze dar. Auf der rechten Seite ist eine unbenutzte Spitze gleichen Typs abgebildet.

dass die Spitze bei der weitesten Annäherung an die Probe deren Oberfläche berührt, während beim NC-AFM nur die attraktiven Kräfte in Oberflächennähe zur Messung ausgenutzt werden [47].

## 2.2 Modellbildung

Das Raster-Kraft-Mikroskop ist ein Messinstrument, welches grundlegend auf der Bestimmung der Kraftwechselwirkung zwischen einer Messspitze und einer Messprobe basiert.

Mit der Annäherung der Spitze an die Probe wird diese über Kräfte mit der Probe wechselwirken und damit den Federbalken auslenken oder ihn in seiner Dynamik beeinflussen. Die dabei auftretenden Wechselwirkungskräfte können unterschiedlicher Natur (z.B. van-der-Waals-, elektrische oder magnetische Kräfte) sein [48, 49, 40]. Damit sind deren Stärke und Reichweite ohne weitere Annahmen nicht näher bekannt und sie werden in der Regel mit einem Bereich der Spitze interagieren, wie es in der Abbildung 2.7 angedeutet ist.

Somit kommt mindestens der geometrischen Form und dem Material der Spitze eine wesentliche Bedeutung bei vielen Ansätzen der quantitativen Modellierung einer Wechselwirkung zu. Unter eingeschränkten Voraussetzungen ist es möglich, Spitzengeometrien [50, 51] zu ermitteln und sie für die quantitative Bildauswertung [52, 53, 54, 55, 56] zu nutzen.

Für viele Messungen können solche Charakterisierungen nicht vorgenommen werden oder sie werden durch Materialaustausch zwischen Probe und Spitze verfälscht. Dieses Problem wird durch einen verallgemeinerten An-

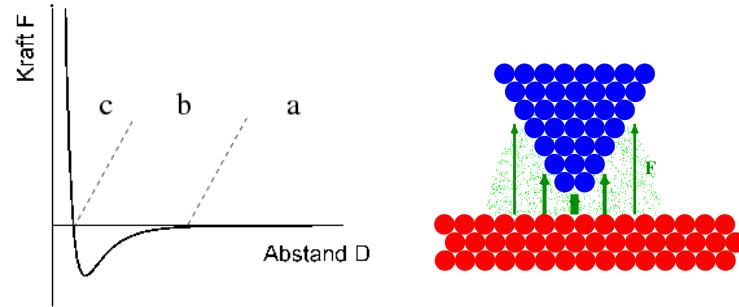


Abbildung 2.7: Schema der allgemein zu erwartenden Wechselwirkungskraft bei der Annäherung einer Spitze an eine Oberfläche. Wegen der großen Reichweite (viele nm möglich) der auftretenden Kräfte gibt es zwischen vielen Atomen der Spitze und der Probe einen Beitrag zur gemessenen Kraft.

satz, der die Summe aller an einem Ort vorkommenden Wechselwirkungen zusammenfasst, in der Modellierung beseitigt. Alle zwischen Probe und Spitze wirkenden Kräfte werden in der orts- und zeitabhängigen Kraft  $F$  zusammengefasst. Dieser Ansatz besitzt damit keine Vorannahmen bezüglich konkreter Eigenschaften der Spitze oder auch der konkreten anzunehmenden Wechselwirkungen.

Ein allgemeines Schema einer möglichen Abstandsfunktion einer Wechselwirkungskraft  $F$  zeigt die Abbildung 2.7. Die Bereiche  $a$ ,  $b$  und  $c$  stehen für Distanzen, wo keine Wechselwirkungskraft registriert werden kann ( $a$ ), einen Bereich in der Nähe der Probenoberfläche ( $b$ ), wo in der Regel anziehende van-der-Waals Kräfte gemessen werden können und einen Bereich repulsiver Kräfte ( $c$ ) durch die direkte Interaktion der elektronischen Zustände von Spitze und Probe. [57]

Neben der Behandlung der Spitze und ihrer Wechselwirkung mit der Probe ist gleichermaßen ein Modell für den Kraftsensor, den Federbalken, notwendig. Häufig wird der Federbalken als eine masselose Feder mit der Federkonstante  $k_c$  und der Dämpfungskonstante  $\beta_c$  mit einer Punktmasse  $m^*$  am Ende dargestellt. Für kleine Auslenkungen und für Oszillationen in der Umgebung seiner Eigenresonanz arbeitet das Modell hinreichend genau [57]. Der mathematische Aufwand für eine Modellierung des Federbalkens als einseitig eingespannter Balken in einfach rechteckiger oder anderer Geometrie führt in der Regel zu keinen analytischen Ausdrücken als Ergebnis und hat oftmals auch viele im Regelfall nicht vollständig experimentell bestimmbare Eingangsparameter.



Gleiche oder sehr ähnliche Modelle werden in verschiedenen Quellen vorgeschlagen. Wesentliche Abbildungseigenschaften des Raster-Kraft-Mikroskops können offensichtlich mit diesem Ansatz beschrieben werden, obwohl viele Details durch den Ansatz nicht berücksichtigt werden. [58, 59]

In diesem Koordinatensystem werden nun, wie in der Abbildung 2.8 dargestellt, für eine mathematische Beschreibung des Modells eine Reihe von Hilfspunkten und Abstände definiert.

$$D = z_0 - z_t - d - b = Z - d - b \quad (2.3)$$

Der Index 0 bezeichnet die Ruhelage. Die Auslenkung des Federbalkens ist  $d$ , eine Änderung der Probenhöhe wird durch  $b$  und der Abstand der Spitze zur Probe wird durch  $D$  dargestellt.  $\beta_p$  und  $k_p$  stehen im Modell für die lokale Dämpfungskonstante und die Federkonstante der Probe.

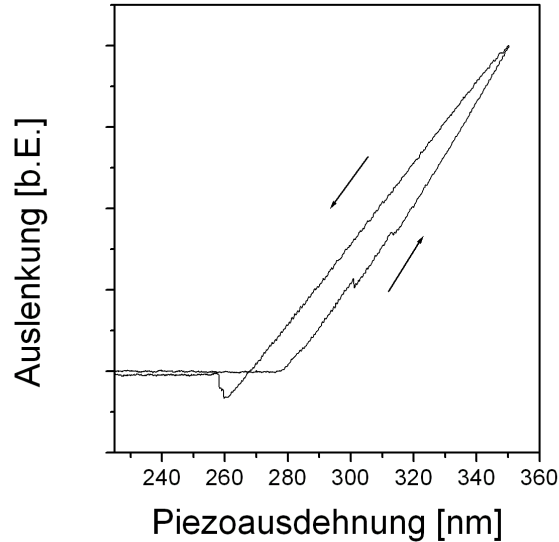


Abbildung 2.9: Gemessene Kraft-Ausdehnungs-Kurve auf einer Lipidschicht in Wasser. Die Pfeile geben die jeweilige Bewegungsrichtung des Piezos an. Es wird keine starke Anziehung bei der Annäherung an die Probenoberfläche gemessen. Nach dem Kontakt erfolgt eine Auslenkung des Federbalkens infolge der repulsiven Wechselwirkung mit der Probenoberfläche. Beim Rückzug des Federbalkens wird eine Adhäsion beobachtet. Der unterschiedliche Anstieg der Kurven im Kontaktbereich zeigt ebenfalls eine Hysterese des Piezos.

### 2.2.1 Annäherung der Messprobe im quasi-statischen Modus

Um die Arbeitsweise des Raster-Kraft-Mikroskops zu verstehen, können jetzt im Modell für den quasi-statischen und im dynamischen Fall, welcher im folgenden Abschnitt 2.2.2 behandelt wird, ein Abstandsexperiment theoretisch ausgeführt werden. Ein Ergebnis einer solchen Messung im quasi-statischen Fall wird Kraft-Abstands-Kurve (force-distance-curve) bezeichnet. Im dynamischen Fall hat sich der Begriff dynamische Kraftspektroskopie (dynamic-force-curve) eingeführt.

Der Name des Experiments im quasi-statischen Betrieb, Kraft-Abstands-Kurve, suggeriert eine Messung der auftretende Kraft  $F$  in direkter Abhängigkeit vom Abstand  $D$  der Messspitze zur Probenoberfläche. Betrachtet man den Ablauf dieses Experiments jedoch genau, wird durch die Messdaten eine Abhängigkeit zwischen der Wechselwirkungskraft  $F$  und der  $z$ -Piezo-

Ausdehnung  $z_t$  wiedergegeben. Es wird also eine Kraft-*Ausdehnungs*-Kurve  $F(z_t)$  gemessen. Um zu einer Kraft-*Abstands*-Kurve  $F(D)$  zu gelangen, wären Umrechnungen und Modellanpassungen, wie z.B. in [60], vorzunehmen.

Auswertungen gemessener Kraft-Ausdehnungs-Kurven sind dadurch erschwert, dass für die Auswertung eine Reihe von Größen betrachtet werden, welche jedoch nur zum Teil direkte Messgrößen im Experiment sind. In der Abbildung 2.8 sind alle für eine vereinfachte Auswertung notwendigen Variablen definiert. Die Federkonstante  $k_c$  des Federbalkens kann durch ein Experiment bestimmt werden oder ist durch den Hersteller gegeben [61, 62, 63]. Die Auslenkung  $d$  des Federbalkens wird durch den Auslenkungsdetektor gemessen und die Ausdehnung des Piezos, auf welchem die Probe montiert ist beschreibt  $\Delta Z$ . Bis auf eine unbekannte Konstante ist damit auch  $Z$ , der Abstand der Spitze zur Probenoberfläche in Ruhelage, bekannt. Im einfachsten Fall können  $\beta_c$  und  $\beta_p$  als 0 angenommen werden.

Die Auslenkung des Federbalkens als Folge der Kraftwechselwirkung zwischen Spitze und Probe wird für kleine Auslenkungen damit durch das Hook'sche Gesetz beschrieben [64],

$$F_c = -k_c d \quad (2.4)$$

was für die kleinen Auslenkungen eine gute Beschreibung darstellt.

Eine Interpretation der Messung in Abbildung 2.9 hinsichtlich der auftretenden Kraftwechselwirkungen ist damit möglich. Weit entfernt von der Probe bei geringen Piezoausdehnungen wird keine Kraft durch den Federbalken gemessen. Infolge der Ausdehnung des Piezos und der damit verbundenen Annäherung der Spitze kommt es nach dem Auftreffen der Spitze auf der Oberfläche durch die Wechselwirkungskraft zu einer messbaren Auslenkung des Cantilevers. Die Abbildung stellt eine Messung auf einer Lipidoberfläche in Wasser dar. Eine Erhöhung der Auflagekraft durch eine weitere Ausdehnung des z-Piezos führt zu einem Eindringen in die Oberfläche, was einen kleinen „Kink“ verursacht.

Beim Zurückziehen bleibt zunächst die Spitze an der Probe haften und verursacht eine Auslenkung der Spitze über die Ruhelage hinaus. Bei einer gewissen Kraft reißt die Spitze ab und bewegt sich zurück in die Ausgangslage.

Eine Auswahl des Sollwertes der Wechselwirkungskraft bei Flächenscans im Kontakt-Modus kann mit Hilfe der ausgeführten Betrachtungen vorgenommen werden. Für eine Auswertung der Kraft-Abstands-Messungen als eigenständiges Experiment müssen weitere Aspekte berücksichtigt werden, jedoch wurden Experimente auf der Basis einer detaillierten Auswertung der Kraft-Abstands-Kurve in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 2.2.2 Annäherung im dynamischen Modus

Im dynamischen Modus wird der Federbalken durch periodische Krafteinwirkung in oder in der Nähe seiner Resonanz zu Schwingungen angeregt. Durch die Wechselwirkung der Spitze mit der Probe, verändern sich die Schwingungseigenschaften des Federbalkens. In erster Näherung wird beim Betrieb an Luft oder in Flüssigkeiten, wo mit einer festen Frequenz angeregt wird, eine Änderung der Amplitude in Verbindung mit einer Phasenverschiebung relativ zur Anregung beobachtet.

Die mathematische Beschreibung dieses Modus basiert auf der Verwendung eines vereinfachten Modells, welches schon für den Kontakt-Modus gebraucht wurde. Problematisch ist erneut die unbekannte Funktion der Wechselwirkungskraft zwischen Probe und Spitze. Für spezielle Problemstellungen existieren Ansätze, welche Messergebnisse mit konkreten Wechselwirkungen in Zusammenhang bringen [40]. Für die Abbildung vollständig unbekannter Proben muss auf sehr allgemein formulierte Ansätze für die Wechselwirkung zurückgegriffen werden. Dennoch können grundlegende Abbildungseigenschaften abgeleitet werden.

#### Erzwungene Schwingung

Ohne die Einwirkung weiterer externer Kräfte als der periodischen Anregungskraft entspricht der Modellansatz für den Federbalken einem fremdgetriebenen harmonischen Oszillator, welcher durch die periodische Kraft  $F_0 \cos \omega t$  angetrieben wird. Die Bewegungsgleichung des Systems lautet:

$$m^* \ddot{z}_s + m^* \gamma_c \dot{z}_s + k_c z_s = F_0 \cos \omega t. \quad (2.5)$$

Die Lösung dieser inhomogenen Differentialgleichung 2. Ordnung setzt sich mathematisch als Summe aus der Lösung der homogenen Gleichung und einer inhomogenen Lösung zusammen. Für Zeiten  $(\gamma_c t) \gg 1$  ist die homogene Lösung (gedämpfte Schwingung) abgeklungen und man registriert die inhomogene Lösung als stationären Zustand, welcher hier betrachtet wird.

Als Ansatz für die inhomogene Lösung eignet sich

$$z_s = A \cos(\omega t - \delta). \quad (2.6)$$

Eingesetzt in 2.5 ergeben sich der Tangens der Phase  $\delta$  und die Amplitude

A zu:

$$\tan(\delta) = \frac{\gamma_c \omega}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad (2.7)$$

$$A = \frac{F_0/m^*}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 \gamma_c^2}} \quad (2.8)$$

$$= \frac{F_0}{m^* \gamma_c \omega_0} \frac{\omega_0/\omega}{\sqrt{1 + Q^2(\omega_0/\omega - \omega/\omega_0)^2}} \quad (2.9)$$

Die Amplitude  $A$  besitzt ein Maximum bei  $\omega_r = \sqrt{\omega_0^2 - \gamma_c^2/2}$ , der Resonanzfrequenz, welche wegen der Dämpfung etwas unterhalb von  $\omega_0$ , der Eigenfrequenz, liegt.  $Q = \frac{\omega_0}{\gamma_c}$  steht für die experimentell bestimmbare Güte oder den Gütefaktor (z.B. [65]).

### Erzwungene Schwingung mit zusätzlicher Kraft

Ein harmonischer Oszillator schließt keine Interaktion mit einer Probe ein, womit das Modell für die Erklärung der Funktion eines Raster-Kraft-Mikroskops nicht ausreichend ist und erweitert werden muss. Liegt die Situation eines stationär eingeschwungenen Zustandes vor, kann die Wechselwirkung mit der Probe als weitere periodisch einwirkende externe Kraft angesehen werden. Man kann in diesem Fall die Ortsabhängigkeit der Kraft  $F(D)$  in eine zeitabhängige in  $\omega$  periodische Funktion  $F_z(t)$  überführen, deren Aussehen durch verschiedene Aspekte bestimmt wird. So geht in ihr u.a. die ortsabhängige Funktion  $F(D)$ , die tatsächliche Schwingungsamplitude und die zusätzliche Dämpfung durch die Wechselwirkung mit der Probe ein. Da diese Funktion in  $\omega$  periodisch ist, kann diese zunächst unbekannte Funktion in eine Fourierreihe

$$F_z(t) = \frac{F_{z0}}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos n\omega t + b_n \sin n\omega t) \quad (2.10)$$

zerlegt werden. Die Gleichung 2.5, welche einen harmonischen Oszillator beschreibt, kann damit um eine Interaktion mit der Probe erweitert werden:

$$m^* \ddot{z}_s + m^* \gamma_c \dot{z}_s + k_c z_s = F_0 \cos \omega t + \frac{F_{z0}}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos n\omega t + b_n \sin n\omega t). \quad (2.11)$$

Als Lösungsansatz für diese Gleichung ist

$$z_s = z_0 + \sum_{n=1}^{\infty} A_n \cos(n\omega t + \delta_n) \quad (2.12)$$

geeignet.

Die Differentialgleichung 2.11 separiert sich damit zu

$$\begin{aligned}
 k_c z_0 &= F_{n0} \\
 m^* \ddot{z}_1 + m\gamma \dot{z}_1 + k_c z_1 &= F_0 \cos \omega t + a_1 \cos \omega t + b_1 \sin \omega t \\
 m^* \ddot{z}_2 + m\gamma \dot{z}_2 + k_c z_2 &= a_2 \cos 2\omega t + b_2 \sin 2\omega t \\
 &\vdots \\
 m^* \ddot{z}_n + m\gamma \dot{z}_n + k_c z_n &= a_n \cos n\omega t + b_n \sin n\omega t.
 \end{aligned} \tag{2.13}$$

Die Interaktion mit der Probe führt theoretisch zu einer Anregung sehr vieler Frequenzen im Schwingungsspektrum des Federbalkens. Aus der Praxis weiß man aber, dass die im Wesentlichen sinusförmige Oszillation des Federbalkens in der Anregungsfrequenz  $\omega$  die mit Abstand höchste Amplitude aufweist. Anteile von  $2\omega$ ,  $3\omega$  usw. sind unter allgemeinen Abbildungsbedingungen vorhanden, aber jedoch eher klein gegenüber dem Anteil in  $\omega$  [66, 67].

Andere Ansätze führen eine externe Kraft in der Art eines Fitparameters  $k_p$  und einer zusätzlich durch die Probe verursachten Dämpfung  $\gamma_p$  direkt auf der linken Seite der Gleichung 2.5 ein. Für sehr kleine Amplituden, wofür dieser Ansatz eingeführt wurde, entspricht die Konstante  $k_p$  dem lokalen Anstieg der Kurve  $F(D)$ . Auch wenn dieses Vorgehen durch sehr kleine Amplituden des Federbalkens gerechtfertigt wird und für größere Amplituden der anschauliche Zusammenhang verloren geht, ist dieser Ansatz äquivalent dem  $\omega$ -Anteil (zweite Zeile) in 2.13. Die Gleichung 2.5 verändert sich damit wie folgt:

$$m^* \ddot{z}_s + m^*(\gamma_c + \gamma_p) \dot{z}_s + (k_c + k_p) z_s = F_0 \cos \omega t. \tag{2.14}$$

Der Lösungsansatz für 2.5 löst auch diese Gleichung. Weiterhin gilt  $\omega_0^2 = k_c/m^*$  und es sei zur Vereinfachung der Schreibweise  $\omega_p^2 = k_p/m^*$ .

Analog zu 2.7 und 2.8 ergeben sich folgende Abhängigkeiten:

$$\tan(\delta) = \frac{\omega(\gamma_c + \gamma_p)}{\omega_0^2 + \omega_p^2 - \omega^2} \tag{2.15}$$

$$A = \frac{F_0/m^*}{\sqrt{((\omega_0^2 + \omega_p^2) - \omega^2)^2 + \omega^2(\gamma_c + \gamma_p)^2}} \tag{2.16}$$

Ohne den Einfluss einer Probe ergibt sich das Verhalten eines fremdgetriebenen harmonischen Oszillators. Bei Anregung in  $\omega_0$  wird das Auftreten eines externen Einflusses über  $\gamma_p$  und  $\omega_p$  zu einer Verringerung der Amplitude und einer Verschiebung der Phase der Oszillation führen. Durch eine alleinige Betrachtung der Phase oder der Amplitude wäre nicht zu klären, welcher

Natur die externe Wechselwirkung ist. Lediglich ein Vorzeichenwechsel von  $k_p$  ist durch den Vorzeichenwechsel in  $\tan(\delta)$  eindeutig zuzuordnen. Dieser würde bei einem Vorzeichenwechsel der Ableitung der Wechselwirkungskraft auftreten.

### Aspekte des Energieumsatzes

Für den Fall eines stationär eingeschwungenen Systems wie 2.14 kann man durch ein Zeitintegral die über eine volle Oszillationsperiode die geleistete Arbeit berechnen.

$$W = \int F(s)ds = \int_0^T \dot{x}F(t)dt \quad (2.17)$$

Das durch 2.14 beschriebene System besitzt im Dämpfungsterm zwei Kanäle zur Dissipation von Energie. Dies ist die Eigendämpfung des Federbalkens ( $\gamma_c$ ) und die Dämpfung durch die Wechselwirkung mit der Probe ( $\gamma_p$ ). Die umgesetzte Arbeit dabei ist:  $\int_0^T m^*(\gamma_c + \gamma_p)\dot{x}^2 dt = \pi m^* A^2 \omega (\gamma_c + \gamma_p)$ . Die hier verbrauchte Energie wird durch den Antrieb bereitgestellt:  $\int_0^T \dot{x}F_{Antrieb} dt = \pi A F_0 \sin(\delta)$ . Der Anteil von  $(k_c + k_p)x$  ist wegen des Potenzialcharakters null. Da Energieerhaltung gelten muss, folgt:

$$\pi m^* A^2 \omega (\gamma_c + \gamma_p) = \pi A F_0 \sin(\delta). \quad (2.18)$$

Nach Umstellung erhält man:

$$\gamma_p = \sin(\delta) \frac{1}{A} \frac{F_0}{m^* \omega} - \gamma_c. \quad (2.19)$$

In 2.15 eingesetzt erhält man einen Ausdruck für  $k_p$ .

$$k_p = \frac{F_0}{A} \cos(\delta) - k_c - \omega m^* \quad (2.20)$$

Für sehr kleine Oszillationen des Federbalkens ist der Parameter praktisch gleich dem lokalen Gradienten der Wechselwirkungskraft  $F(D)$ . Für sehr große Amplituden hingegen ist diese lokale Zuordnung nicht mehr sinnvoll und  $k_p$  stellt nur noch einen Anteil einer sich komplexer zusammensetzenden Wechselwirkungskraft dar.

**Anregungsvariante** Für den Fall der direkten magnetischen Anregung (MAC-Modus) entspricht der Term  $F_0 \cos \omega t$  in Gleichung 2.5 der Kraft durch das von außen wirkende wechselnde magnetische Feld und  $z_c$  ist konstant null. Im Fall der Vibrationsanregung wird eine periodische Krafteinwirkung technisch durch einen Piezo an der Federbalkenaufhängung erzielt, welcher

durch eine oszillierende äußere angelegte Spannung ständig in seiner Ausdehnung variiert. Die Koordinate  $z_c$  wird damit in der Form  $z_c = a_0 \cos(\omega t)$  zeitabhängig. Die Gleichung 2.5 verändert sich damit wie folgt:

$$m^* \ddot{z}_s + m^* \gamma_c \dot{z}_s + k_c z_s = k_c a_0 \cos \omega t. \quad (2.21)$$

Formal tritt damit das  $k_c a_0$  an die Stelle von  $F_0$  und die gesamte Folge-rechnung ist damit äquivalent. Da aber durch das Detektionssystem nur die Auslenkung  $d = z_s - z_c$  des Federbalkens gemessen wird, führt die zeitliche Veränderung von  $z_c$  zu einer Veränderung der gemessenen Schwingungseigen-schaften des Federbalkens. Eine Rechnung ergibt:

$$d = z_s - z_c = A_0 \cos(\omega t - \delta) - a_0 \cos(\omega t) \quad (2.22)$$

$$= \{A_0 \cos(\delta) - a_0\} \cos(\omega t) + \{A_0 \sin(\delta)\} \sin(\omega t) \quad (2.23)$$

$$= \hat{A}_0 \cos(\omega t - \hat{\delta}). \quad (2.24)$$

$\hat{A}_0$  und  $\tan(\hat{\delta})$  ergeben sich zu:

$$\hat{A}_0 = A_0^2 + 2A_0 a_0 \cos \delta + a_0^2 \quad (2.25)$$

$$= A_0^2 \left(1 + \frac{2 \cos(\delta)}{\frac{A_0}{a_0}} + \frac{1}{\left(\frac{A_0}{a_0}\right)^2}\right) \quad (2.26)$$

$$\tan(\hat{\delta}) = \frac{\sin(\delta)}{\cos(\delta) - \frac{a_0}{A_0}} \quad (2.27)$$

Die gemessenen Phasen sind damit abhängig von der Amplitude und die gemessene Amplitude wird abhängig von der Phase der Federbalkenschwin-gung. Ist  $a_0$  klein gegenüber  $A_0$ , was bei der Resonanzanregung ( $\omega = \omega_0$ ) zur Abbildung an Luft der Fall ist ( $\frac{A_0}{a_0} = Q \gg 100$ ), sind die gemessenen Eigenschaften nicht wesentlich verfälscht. Sämtliche im weiteren Verlauf an-gestellten Betrachtungen werden für die direkte Anregung durch eine externe Kraft angestellt. Ergebnisse gelten aber im Wesentlichen wegen der meist ge-ringen Beeinflussung des Messergebnisses durch die Vibrationsanregung stets für beide Anregungsvarianten.

## 2.3 Betrieb im dynamischen Modus

Der Betrieb eines Raster-Kraft-Mikroskops im dynamischen Modus besitzt seine Basis in der komplexen Wechselwirkung zwischen der Probe und der os-zillierenden Spitze. Eine Modellierung, wie sie im vorangegangenen Abschnitt 2.2.2 vorgenommen wurde, ermöglicht ein grundsätzliches Verständnis der Abbildung und der während der Abbildung erhaltenen Messwerte.



Im dynamischen Betrieb an Luft oder in Flüssigkeiten wird der Federbalken zu Oszillationen in oder in der Nähe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Die Dämpfung durch das umgebende Medium, also der Luft oder die Flüssigkeit, führt zu Resonanzen, welche typischerweise eine Güte von ca. 500 in Luft und kleiner als 10 in Wasser besitzen. Elektronische Hilfsmittel können zur Verbesserung der Güte angewendet werden [68, 69, 37, 57]. Anders als im Vakuum, wo der Federbalken als frequenzbestimmendes Glied im Resonanzkreis wirkt, wird unter den verwendeten Abbildungsbedingungen der Cantilever durch eine externe Anregung bei einer festen Frequenz zu Schwingungen angeregt.

In Abhängigkeit von der Interaktion der Spitze mit der Probe werden sich die messbaren Parameter der Federbalkenoszillation verändern. In den durchgeführten Experimenten wurden die Amplitude und Phase der Schwingung des Federbalkens relativ zur Anregung gemessen.

Im dynamischen Betrieb gibt es verschiedene Experimente, welche Informationen über die Probenoberfläche geben. Die komplexe Interaktion der Spitze am oszillierenden Federbalken mit der Probenoberfläche kommt der Wahl geeigneter Abbildungsparameter eine Bedeutung zu. Abbildungsparameter stellen die Anregungsfrequenz, die Anregungsstärke und der Sollwert der Amplitude (Setpoint) während der Abbildung dar. Alle drei Parameter haben einen Einfluss auf die erhaltenen Messergebnisse und werden in der Regel experimentell vor einem Flächenscan ermittelt. Die Gleichungen 2.20 und 2.19 des Modells zeigen, dass alle 3 Parameter einen direkten Einfluss auf die während der Abbildung auf die Probenoberfläche ausgeübte Kraft und die eingetragene Energie ausüben. Eine ungünstige Wahl kann zu messbaren Veränderungen der Probe durch den Messprozess führen [68]. Ungeachtet dessen bietet die Abbildung im dynamischen Modus sehr günstige Voraussetzungen für Abbildungen mit geringen Kräften in vertikaler und lateraler Richtung [70, 44, 71].

Zur Vorbereitung einer Flächenabbildung mit dem RKM wird im Regelfall ein Punktexperiment durchgeführt, durch das die Möglichkeit besteht, bei fixer Anregungsfrequenz und -stärke die Oszillationsamplitude und die Phase in Abhängigkeit vom Probenabstand zu untersuchen. Die Abbildung 2.10a) zeigt eine solche experimentell gewonnene Kurve. Weit weg von der Probenoberfläche, oszilliert der Federbalken mit einer Amplitude  $A_0$ . Bei einer Ausdehnung von etwa 400 nm führt die einsetzende Interaktion mit der Probe zu einer Beeinflussung der Oszillation und damit zu einer Abnahme der gemessenen Amplitude. Deutlich sichtbar ist weiterhin ein „Kink“, welcher den Übergang zwischen zwei Wechselwirkungstypen charakterisiert.

Während der Annäherung an die Probe, wirken im Regelfall zunächst attraktive Kräfte auf die Spitze und führen zu der beobachteten Abnahme der

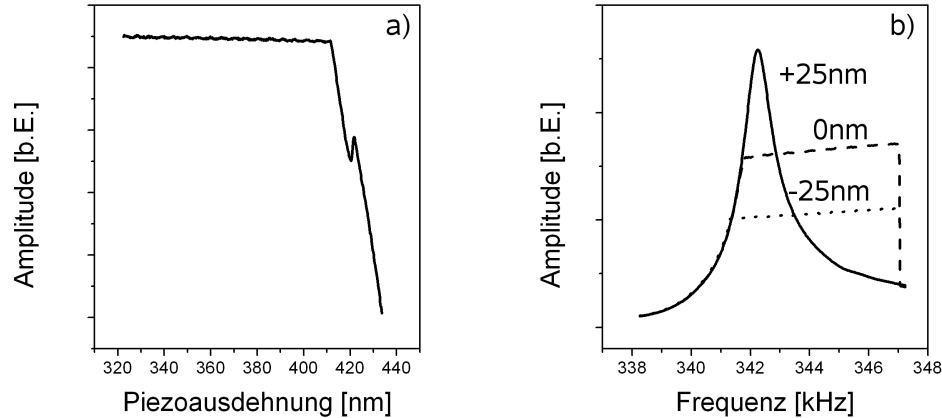


Abbildung 2.10: a) Die dynamische Kraftkurve zeigt die Abhängigkeit der Amplitude der Federbalkenschwingung von der Piezoausdehnung und ist das Äquivalent zur Kraft-Ausdehnung-Kurve im dynamischen Fall. b) Das Spektrum der Amplitude der Federbalkenschwingung weist eine starke Abhängigkeit von der Interaktion mit der Probenoberfläche auf. Die hier dargestellten Kurven zeigen das Spektrum in einem Abstand von +25, 0 und -25 nm über dem Abstand, der für das Feedback ausgewählt wurde. Diese „abgeschnitten“ (engl. truncated) Resonanzen sind typisch für den Betrieb an Luft.

Amplitude. Bei weiterer Annäherung wird die Spitze in der Nähe der Probenoberfläche repulsiven Kräften ausgesetzt. Auch diese Kräfte führen zu einer Abnahme der gemessenen Amplitude der Federbalkenschwingung. Die im Allgemeinen anharmonische Wechselwirkungskraft zwischen Spitze und Probe führt während der Abbildung in einem bestimmten Abstandsbereich, zu einem bistabilen Schwingungsverhalten [72, 73, 74]. Für Abbildungen ist ein Amplitudensollwert in diesem Bereich problematisch, da ein Springen zwischen den verschiedenen Abbildungsbedingungen zu einer Fehlinterpretation gemessener Höhen führen kann [75, 76].

Wird die Anregungsfrequenz bei festem Probenabstand geändert, werden Spektren gewonnen, wie sie in Abbildung 2.10b) dargestellt sind. Weit entfernt von der Probe werden normale Resonanzkurven eines fremdangeregten harmonischen Oszillators erhalten. Tritt die Wechselwirkung mit der Probe hinzu, erscheinen charakteristische Veränderungen, welche plateauartig ausgebildet sind. In Abhängigkeit von der Sweeprichtung wird eine Amplituden-erhöhung für Frequenzen beobachtet, welche außerhalb der ursprünglichen Resonanz liegen. Es hat sich herausgestellt, dass verschiedene Einflüsse zu den beobachteten Spektren führen und diese gegebenenfalls zur Untersuchung

von Oberflächeneigenschaften herangezogen werden könnten [77, 43, 78].

Aus den beiden Experimenten können die notwendigen Informationen für die Wahl der Abbildungsparameter abgeleitet werden, um Flächescans im dynamischen Modus auszuführen. Ein wesentlicher Aspekt ist die Vermeidung von bistabilen Schwingungszuständen des Federbalkens während der Abbildung. In der Regel wird eine Anregungsfrequenz in der Nähe des Resonanzmaximums eingestellt und eine Sollwertamplitude bestimmt, die einen Betrieb der Raster-Kraft-Mikroskops außerhalb des Bereichs mit bistabilem Verhalten gewährleistet. Das Auftreten der Bistabilität ist nicht zwingend und hängt von der Wahl der Abbildungsparameter ab.

Flächenscans, welche auf der ausschließlichen Nutzung der attraktiven Wechselwirkungskräfte basieren, werden als NC-AFM Abbildungen (non contact) bezeichnet. Werden durch den gewählten Setpoint ebenfalls repulsive Kräfte zur Abbildung genutzt, wird der Modus als TM-AFM Abbildung (tapping mode) bezeichnet.

Bei Flächenabbildungen mit dem RKM im dynamischen Modus wird der Regelsollwert durch die Amplitude der Oszillation des Federbalkens in  $f_{drv}$ , seiner Anregungsfrequenz, dargestellt. Die Phase des Federbalkens relativ zur Anregung ist damit frei. Eine parallele Aufzeichnung der Phase führt zu Phasenkontrastabbildungen. Der Phasenkontrast wird wesentlich durch den Energieeintrag in die Probenoberfläche mitbestimmt [79], wie es auch in Gleichung 2.15 über den Parameter  $\gamma_p$  abzulesen ist. Damit eröffnet der Phasenkontrast eine Möglichkeit, Unterschiede in der Wechselwirkung, welche durch unterschiedliche Materialien hervorgerufen werden können, lateral durch die Raster-Kraft-Mikroskopie aufzulösen. Es ist damit die Möglichkeit gegeben, chemische oder physikalische Inhomogenitäten auf der Probenoberfläche zu untersuchen, welche nicht zwingend topographische Veränderungen hervorrufen [80, 81, 82].

Grundsätzlich funktioniert die Abbildung im dynamischen Modus in der beschriebenen Weise an Luft und in Flüssigkeiten. Probleme mit der Anregung des Federbalkens in Flüssigkeiten lassen sich durch verschiedene Ansätze lösen [34, 35, 36, 37, 83, 84, 30, 33]. Die Anregung über ein externes Magnetfeld, MAC-Modus, erweist sich dabei als sehr effizient und wurde für die Abbildungen im dynamischen Modus in Flüssigkeiten verwendet.

## 2.4 Lithographie

Das Raster-Kraft-Mikroskop wurde als Instrument zur topographischen Abbildung von Oberflächen entworfen. Als herausstellende Merkmale bringt es die Option mit, leitende und nichtleitende Oberflächen unter verschiedenen



Abbildung 2.11: RKM-Abbildung einer Lithographie in einer organischen Oberfläche aus Mono-, Bi- und Triglyzeriden (Cetylpalmitat). Die Lithographie wurde durch Erhöhung der Amplitude des Vibrationspiezos an den zur Lithographie vorgesehen Stellen während eines Scans im dynamischen Modus an Luft erzielt. Die erzielten Indentationstiefen entsprechen mit 5-10 nm einer Tiefe von 1-2 Bilayern der Glyzeride.

Umgebungsbedingungen abbilden zu können und durch eine geeignete Wahl des Messmodus ist es auch möglich, sehr sensible, leicht zu verändernde, Oberflächen zu untersuchen. Aber genau die Wahl des Messmodus und die Weise der Steuerung des RKM erlauben es auch, gezielt Veränderungen an Oberflächen vorzunehmen.

Verschiedene Ansätze [2, 3, 4, 85, 86] werden verfolgt, um Lithographie mit dem Raster-Kraft-Mikroskop zu betreiben. Durch das Anlegen einer Spannung, kann eine elektrochemische Reaktion den Zustand der Oberfläche an den durch den Lithographieprozess betroffenen Stellen verändern [87]. Eine andere Richtung wird durch Experimente verfolgt, die darauf abzielen, an ausgewählten Stellen hohe mechanische Kräfte auszuüben und/oder einen besonders hohen Energieeintrag durch die Wechselwirkung des Federbalkens mit der Probenoberfläche zu erzielen [4].

Die Fähigkeit mit dem RKM Lithographie zu betreiben stellt eine Möglichkeit dar, die in den vorigen Abschnitten ausgeführten Betrachtungen über die Interaktion des Federbalkens mit der Probenoberfläche zu prüfen, da die Kenntnis um die Herbeiführung einer gezielten Veränderung der Oberfläche ebenfalls die Kenntnis zur Vermeidung einer Veränderung einschließt.

Folglich wurden Lithographievarianten erprobt, welche sich an verwendete Messmodi anlehnen. Um einen lithographischen Effekt zu erzielen, wurde das RKM in einem dynamischen Modus betrieben und an den Stellen, an denen eine Modifikation der Oberfläche erfolgen sollte, durch die Steuerung

die Amplitude der Antriebskraft ( $F_0$ ) des Federbalkens erhöht. Im Fall eines frei schwingenden Federbalkens würde sich dadurch dessen Schwingungsamplitude vergrößern (siehe Gleichung 2.16). Das Feedbacksystem führt jedoch den Federbalken dichter an die Oberfläche heran und hält dessen Amplitude konstant. Nach Gleichung 2.19 und 2.20 erhöhen sich damit die auf die Probe ausgeübte Wechselwirkungskraft  $k_p$  und die durch die lokale Wechselwirkung eingetragene Energie  $\gamma_p$ . Analog könnte aber auch die Amplitude  $A$  der Federbalkenoszillation durch das Feedbacksystem verringert werden, was nach den Gleichungen 2.19 und 2.20 ebenfalls die ausgeübte Kraft und die eingetragene Energie erhöht.

Beide Varianten der Lithographie wurden in der Steuerung des Raster-Kraft-Mikroskops implementiert und erfolgreich getestet. Ein Beispiel zeigt die Abbildung 2.11, welche eine Lithographie in einer wachsartigen Schicht zeigt. Dieser durch die Methode des Auftrags aus einer Lösung (solution spreading) hergestellte Multilayerfilm besteht aus einer Mischung von Mono-, Bi- und Triglyzeriden (Handelsname ist Cetylpalmitat) und ähnelt damit stark Lipidfilmen, welche durch Lipide im fest-kristallinen Zustand  $L_\beta$  gebildet werden. Die hier gezeigte Lithographie wurde durch die erstgenannte Methode hergestellt.

Die technischen Modifikationen an der Steuerung eines RKM betreffen nur eine definierte Veränderung der Anregungsschwingung oder des Sollwertes (Setpoint) der Federbalkenoszillation und entsprechen damit stets den durch den Operator einstellbaren Abbildungsbedingungen. Die Versuche haben gezeigt, dass Filme aus lipidähnlichen Substanzen durch eine ungünstige Wahl der Abbildungsbedingungen dauerhaft modifiziert werden können. Die Wahl einer möglichst geringen Anregungskraft  $F_0$  und einer hohen Abbildungsamplitude  $A$  geben eine Option auch zur Abbildung lipidartiger Filme und ähnlich empfindlicher Oberflächen ohne eine dauerhafte Modifikation zu erzielen.

## 2.5 technischen Realisation

Für die Realisierung der Experimente wurde ein Raster-Kraft-Mikroskop neu zusammengestellt. Das Gerät wurde dabei so gestaltet, dass verhältnismäßig große Objekte an Luft und unter chemisch definierten Bedingungen in Flüssigkeiten auf unterschiedlich gestalteten Probenträgern untersucht werden konnten. Für die Untersuchungen in Flüssigkeiten mussten Aspekte der chemischen Beständigkeit der Materialien und der Möglichkeit der Reinigung beachtet werden. Eine Adaption eines vorhandenen kommerziellen Gerätes war wegen der umfangreichen Anforderungen an die Flexibilität zu diesem

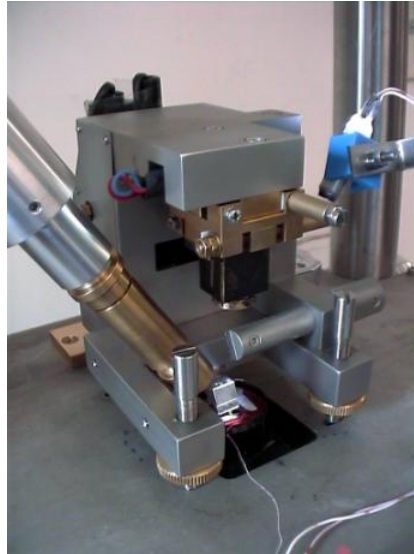


Abbildung 2.12: Eine Ansicht des aufgebauten Raster-Kraft-Mikroskops. Zu sehen sind der Mikroskopkopf und die Mikroskopbasis. Am Mikroskopkopf zu erkennen sind die zwei Justierschrauben der manuellen Positionierung, der Umlenkspiegel des Positionsdetektors, das Lasergehäuse mit Justageeinheit, die Mikroskopkamera und ein Chipträger mit Federbalken über der Probe.

Zeitpunkt nicht möglich, wenngleich verschiedene technische Lösungen in das neue Gerät übernommen wurden. Es entspricht dem in Abbildung 2.2 gezeigten Schema.

Das Gerät selber besteht aus dem Mikroskopkopf, welcher auf eine Grundplattform, die Mikroskopbasis, gestellt wird. Mit der Mikroskopbasis fest verbunden ist ein Grobpositionierungssystem zur manuellen Justage der Piezo- und Probenhaltereinheit in der  $xy$ -Ebene. Der  $z$ -Abstand wird über ein Dreibeinsystem des Mikroskopkopfes grobverstellt. Zur computergesteuerten Annäherung der Spitze an die Probe ist eines dieser drei Beine elektromotorisch verstellbar ausgeführt. Das mechanische Verstellsystem ist ein Hilffsystem für das Piezopositioniersystem und ermöglicht eine Verstellung im mm bis  $\mu\text{m}$  Bereich.

Das zweite Positionierungssystem wird ausschließlich durch Piezos bewegt und begründet die Funktion des Raster-Kraft-Mikroskops. Aufgrund der eingangs erwähnten weiten Anforderungen wurde das System durch zwei separat anzusteuern Piezosysteme realisiert. Für große Bewegungen in der  $xy$ -Ebene bis  $50\ \mu\text{m}$  Scanweite konnte auf ein  $xy$ -Verstellelement der Firma PI zurückgegriffen werden, welche in der Größenordnung von 1-2 nm durch den Hersteller hardwarelinearisiert ist. Zentral in dieser Piezoverstelleinheit

montiert befindet sich ein Röhrenscanner mit separiertem  $z$ -Hub. Die Scanweiten und die maximale Scanhöhe sind bei diesem Scanner auf wenige  $\mu\text{m}$  beschränkt. Eine unabhängige, gesteuerte Bewegung in alle 3 Richtungen ( $x$ ,  $y$  und  $z$ ) mit einer nominellen Ortsauflösung im Bereich von  $10^{-10}$  m wurde durch das Positionierungssystem ermöglicht.

Für den Fall von Messungen an Luft wird ein Probenhalter direkt auf dem Röhrenpiezo befestigt, auf dem direkt trockene Proben durch eine Klebung befestigt werden konnten. Der Halter für die Federbalkenchips am Mikroskopkopf war magnetisch ausgeführt, so dass vorkonfektionierte Federbalken einfach zu montieren waren. In diesen Halter integriert war der Vibrationspiezo für die dynamischen Betriebsmodi.

Für Messungen in Flüssigkeiten ist der Probenhalter ebenfalls auf dem mittleren Röhrenpiezo positioniert. Dieser ist wegen der Anforderung der chemischen Beständigkeit aus Teflon gefertigt und nimmt gleichzeitig eine Spule mit Ferritkern auf, welche die Erzeugung eines oszillierenden Magnetfeldes in der Nähe der Probe ermöglicht. Auf diese Weise wird es möglich, Federbalkenoszillationen durch ein externes Magnetfeld anzuregen. Der Federbalkenchipträger besteht für die Messungen in Flüssigkeiten aus einer keramischen Klemmvorrichtung, die ebenfalls chemisch beständig gegenüber Ionen und auch üblichen lipidlösenden Reinigungsmitteln (z.B. Chlorophorm) ist. Ein Fenster unmittelbar über dem Federbalken ermöglicht die konstante Einkopplung des Lasers des Auslenkungsdetektors in die Flüssigkeit und eine ständige Sicht auf die Probe während des Experiments.

Für Messungen an Luft und für Messungen in Flüssigkeiten wurde der gleiche Auslenkungsdetektor benutzt, dessen Prinzip auf der auslenkungsabhängigen Reflektion eines Lichtstrahls beruht. Eine Auslenkung des Federbalkens führt zu einer Lageänderung des Reflektionsspot auf einer 4-Feld-Diode. Über eine Elektronik kann ein zur Auslenkung korreliertes elektrisches Signal gewonnen werden, welches im Fall statischer Messmodi direkt an den DSP-Controller weitergegeben werden kann (siehe Abbildung 2.2). Im Fall dynamischer Messmodi ist das Signal für die Ermittlung von Amplitude und Phase der Federbalkenoszillation verfügbar.

Als Messspitzen kamen Siliziumfederbalken von Nanosensors, MikroMasch und MAC-Lever zum Einsatz.

Für den Neuaufbau wurde ebenfalls eine Steuerung auf DSP-Basis entwickelt. Durch sie wurden die Eingriffe in den Abbildungsmechanismus für die Lithographieexperimente ermöglicht.

Eine Darstellung der gewonnenen Messdaten erfolgte online durch das Messprogramm als farbiger Flächenplot. Die abgespeicherten Daten können durch frei erhältliche Darstellungsprogramme wie WSxM visualisiert werden. Die in der Arbeit gezeigten Grafiken wurden mit dieser Software [88]

bearbeitet, welche frei im Internet unter [www.nanotec.es](http://www.nanotec.es) erhältlich ist.

Die Kalibration des Gerätes wurde durch Abbildungen von Kalibrationsgittern sichergestellt. Die Messungen zur Kalibration wurden an Luft im Kontakt-Modus und im dynamischen Modus ausgeführt. Dafür standen Gitter mit unterschiedlichen Periodizitäten in  $xy$ -Richtung ( $2\text{ }\mu\text{m} - 200\text{ nm}$ ) zur Verfügung.



# Kapitel 3

## Abbildung organischer Oberflächen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop

### 3.1 Problemstellung der Abbildung mit dem RKM

Die Raster-Kraft-Mikroskopie kann zur Untersuchung nichtleitender amorpher Oberflächen benutzt werden, weswegen sie häufig zur Abbildung immobilisierter organischer Strukturen, wie z.B. DNS [89], Proteinen, Peptiden, Zellmembranen und Partikeln aus organischen Materialien herangezogen wird. Einige dieser organischen Strukturen, welche eine Bedeutung in der Entwicklung von Pharmazeutika und ihrer Wirkprinzipien haben, wurden im Rahmen der Arbeit mit dem RKM untersucht.

An diesen Untersuchungen waren Forschergruppen mit einem pharmazeutischen Hintergrund beteiligt, welche sich u.a. mit der Herstellung und der Charakterisierung organischer Partikel (Nanopartikel) und der Interaktion bioaktiver Substanzen mit Zellmembranen beschäftigen. Die Möglichkeiten des Raster-Kraft-Mikroskops sollten für die Untersuchung einer Reihe von Fragen, wie z.B. die Morphologie dieser Partikel oder die Interaktion der Partikel und der Mechanismus der Wirkung der Pharmazeutika aus den Partikeln mit Zelloberflächen genutzt werden. Das Ziel war, Ergebnisse, welche mit anderen Untersuchungsansätzen, wie z.B. Photonenkorrelationsspektroskopie, Diffraktometrie oder Differential Scanning Calometry, erzielt worden sind [90], zu ergänzen.

Partikel und Zellen wurden in einem ersten Schritt mit dem RKM abgebildet, um die Möglichkeiten dieser Technik, einen Beitrag hinsichtlich offe-

ner Fragestellungen zu geben, zu evaluieren. Verschiedene in diesem Kapitel diskutierte Aspekte zeigen, dass die Raster-Kraft-Mikroskopie durchaus Ergebnisse erzielen kann, welche andere Methoden sinnvoll ergänzen. Aber nicht alle Aufgabenstellungen können durch die direkte Nutzung der Partikel oder Zellen als Untersuchungsobjekt für das Raster-Kraft-Mikroskop sinnvoll bearbeitet werden und erfordern die konsequente Entwicklung eines an das RKM angepassten Modells.

## 3.2 Adhärente Partikel

Für die Abbildung mit dem RKM sind verschiedene Partikel benutzt worden, die unterschiedliche Applikationen für Arzneistoffträgersysteme besitzen [90]. Es sind Objekte, die in einem Größenbereich von 10 bis 1000 nm vorkommen können und variabel in deren Zusammensetzung sind. Den Annahmen über den Aufbau der Partikel ist gemeinsam, dass sie einen Partikelkern besitzen, der durch einen Tensidmantel umschlossen wird. Dieser Tensidmantel soll eine Stabilisierung der Partikelgröße bewirken, indem eine Agglomeration einzelner Partikel verhindert wird. Gleichzeitig wird auch die Adhäsion auf Gefäßoberflächen, wie z.B. Glas, unterbunden.

Die untersuchten Partikel werden in Suspensionen hergestellt oder verwendet und sind damit nicht direkt einer Untersuchung mit dem RKM zugänglich, welche auf einer Oberfläche fixierte Objekte erfordert. Der Immobilisierung der Partikel für eine Abbildung mit dem RKM wird durch eine Trocknung der Suspension auf einer Oberfläche [91, 90, 92] möglich. In wässriger Lösung unterbleibt die Haftung an Oberflächen wie Glas, Silizium oder Glimmer wegen der umgebenden Tensidschicht. Dieser Prozess birgt potenziell das Risiko, viele Eigenschaften der Partikel zu verändern. Sehr wesentlich beeinflussen das Material der Partikel und die Beimengungen (Tenside, Puffersalze) die Möglichkeiten der Untersuchung mit dem Raster-Kraft-Mikroskop, weswegen die verschiedenen Partikeltypen für eine Untersuchung mit dieser Methode unterschiedlich zugänglich sind. Es ist damit zu rechnen, dass der Trocknungsprozess die Morphologie der Oberfläche verändert, die Proben weitgehend dehydriert sind und dass es während des Trocknungsprozesses zu einer Clusterung der Partikel kommen kann. Anders als bei einer Untersuchung solcher Proben im Rasterelektronenmikroskop, brauchen die Proben aber nicht in ein Vakuum gebracht werden, womit der Grad der Dehydrierung geringer ist [92]. Eine Immobilisierung durch eine Einbettung in eine Gel-Matrix [93] ist aber im Allgemeinen nicht möglich, da sie spezielle Bedingungen an den Aufbau und die Zusammensetzung der Partikel stellt.

Untersucht wurden unterschiedliche Typen von Partikeln, von denen hier

zwei vorgestellt werden. Es handelt sich um Polymerpartikel und so genannte SLN. Die Bezeichnung SLN ist aus dem englischsprachigen Begriffen „solid lipid nanoparticle“ abgeleitet und beschreibt Partikel, deren Kern sich aus verschiedenen Lipiden und lipidähnlichen Substanzen zusammensetzt und durch eine Tensidhülle umgeben werden. „Solid“ deutet darauf hin, dass es sich um Substanzen handelt, welche sich bei Körpertemperatur in einem kristallinen Zustand befinden [90]. Anders als bei den SLN wird der Kern eines Polymerpartikels durch Polymere wie z.B. Polyalkylcyanoacrylat oder Polystyrol gebildet und ebenfalls durch beigemischte Tenside vor einer Agglomeration geschützt.

Die Partikel wurden von den Kooperationspartnern aus Versuchsserien bereitgestellt. Von daher waren die Suspensionen vor der Verwendung für die Raster-Kraft-Mikroskopie 500 bis 2000fach zu verdünnen [91], um die relative Partikelanzahl und die Konzentration der Beimengungen zu vermindern. Einige  $\mu\text{l}$  dieser verdünnten Suspension wurden auf Siliziumoberflächen oder frisch gespaltenem Glimmer aufgetragen und anschließend einem Trocknungsprozess unterzogen, bevor sie mit dem RKM untersucht wurden .

### 3.2.1 Polymerpartikel

Der Verdünnungs- und Trocknungsprozess wirkt sich unterschiedlich stark auf die Partikel in den Suspensionen aus. Die hier gezeigten Partikel bestehen aus Polyglycedylmethacrylat und überstehen den Prozess. Einzelne Partikel können durch das RKM abgebildet werden, wie es in der Abbildung 3.1 zu sehen ist.

In der Abbildung 3.1 dargestellt sind Polymerpartikel aus einer Suspension, welche auf frisch gespaltenem Glimmer aufgetragen und getrocknet wurde. Die Abbildung selbst erfolgte an Luft unter Umgebungsbedingungen mittels TM-AFM. Die Trockenpräparate solcher Partikelsuspensionen ermöglichen die Visualisierung der Partikel mit dem RKM und ermöglichen eine Messung der Partikelhöhe aus den erhaltenen Abbildungen. Hierzu können Lineplots an den jeweiligen Partikeln herangezogen werden, wie es in der Abbildung 3.1b) dargestellt ist. Die jeweils in der Umgebung der Partikel zu findenden Strukturen deuten an, dass der Trocknungsprozess wahrscheinlich starke Veränderungen an der Hülle der Partikel hervorruft und diese verändert. Das Hüllenmaterial scheint sich um den Partikel herum abzulagern. Gemessene Höhen und damit Durchmesserangaben der Partikel müssen daher nicht zwingend mit Messergebnissen aus anderen Methoden, z.B. der Photonenkorrelationsspektroskopie, übereinstimmen. Dehydration und Veränderungen an der Hülle können systematische Messwertunterschiede hervorrufen.

Die Partikel erscheinen in der Abbildung als konusförmige Objekte. Das

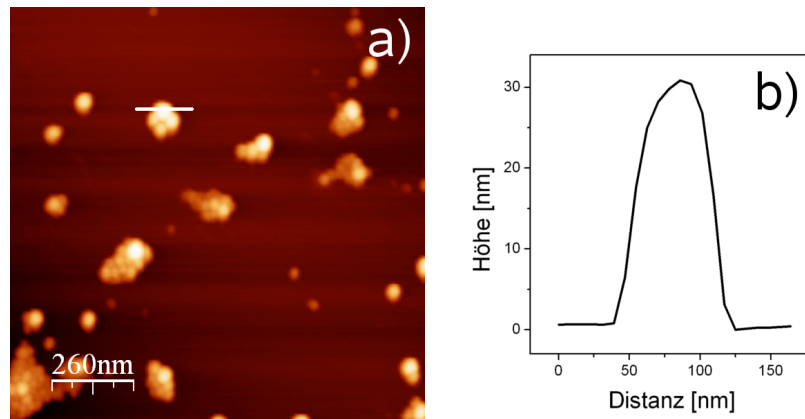


Abbildung 3.1: a) TM-AFM Abbildungen eines Trockenpräparates von Polymerpartikeln aus Polyglycedylmethacrylat auf Glimmer an Luft. Zu sehen sind einzelne Partikel der getrockneten Suspension, welche von einer Struktur umgeben sind, die wahrscheinlich aus Resten der Tensidhülle der Partikel oder durch Agglomeration kleinerer Partikel während der Trocknung gebildet wird. b) Der Linienplot zeigt das gemessene Höhenprofil entlang der Markierung in a).

ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht deren Aussehen. Aufgrund der Größenverhältnisse der Partikel und der Messspitze des RKM ist in der Abbildung im einfachsten Fall eine Faltung aus Spitzenform und Partikelform zu sehen. Ein Teil dieser Effekte kann durch Berechnungen vermindert, jedoch nicht komplett rückgängig gemacht werden [94]. Die Abbildung mit dem RKM ergibt daher nur eine unvollständige Angabe zur ursprünglichen Partikelform.

Ein anderer Aspekt ist, dass die Suspension nicht über die Fläche gleichmäßig trocknet und damit Gebiete mit unterschiedlicher Partikeldichte entstehen. Ein Aufschluss über die Partikelkonzentration kann durch eine Abbildung mit dem RKM nicht erhalten werden.

### 3.2.2 Solid Lipid Nanoparticle (SLN)

Der Kern der SLN aus Lipiden oder lipidartigen Substanzen, die in eine Tensidhülle eingeschlossen sind. Die Substanzen im Kern sind bei Raumtemperatur in einem kristallinen Zustand [90]. Verschiedene Proben solcher SLN wurden für die Abbildung mit dem RKM in gleicher Weise wie die Polymerpartikel vorbereitet und abgebildet. Die Abbildungen 3.2 und 3.3 wurden an zwei verschiedenen Proben an Luft mit TM-AFM gewonnen. Die Abbildung 3.2 zeigt einen Flächenscan als Topographie und Phasenabbildung. Deutlich sichtbar sind in 3.2a) einige geclusterte Bereiche, in welchen sich immobi-

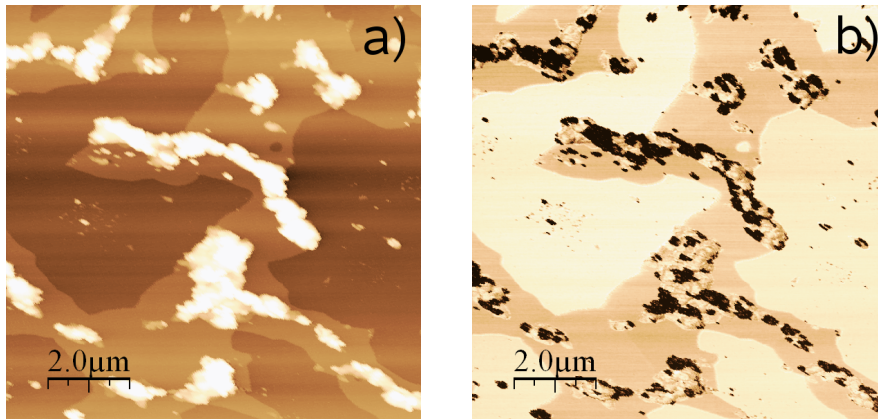


Abbildung 3.2: a) Topographische Abbildung einer getrockneten Suspension von SLN, welche mittels TM-AFM hergestellt wurde. Die Höhenskala beträgt ca. 97 nm. b) Phasenkontrast-Abbildung des gleichen Probenausschnitts. Der Phasenkontrast zeigt 3 wesentliche Kontraststufen, welche mit Strukturen in der Topographieabbildung (a) korrelieren.

sierte Partikel befinden. In der Phasenabbildung 3.2b) desselben Bereiches sind diese Partikel durch einen dunklen Farbton gekennzeichnet, welche durch einen Bereich mit einer anderen Farbe umschlossen werden. Zwei unterschiedliche Farben stehen für unterschiedliche Phasen der Federbalken-Oszillation.

Phasenabbildungen geben Hinweise auf lokale Veränderungen der Federbalkenwechselwirkung mit der Probenoberfläche. Nach Gleichung 2.15 ist der Tangens des Phasenwinkels abhängig von  $k_p$  und  $\gamma_p$ , welches die Feder- bzw. die Dämpfungskonstante der Probe im verwendeten Wechselwirkungsmodell sind. Unterschiedliche Stoffe (oder unterschiedliche Zustände eines Stoffes) werden sich in der Regel durch verschiedene Konstanten  $k_p$  und  $\gamma_p$  auszeichnen. Damit ist eine lokale Veränderung der Phase ein Indiz für eine lokale Veränderung des Materials der Probenoberfläche.

Das die Partikel umgebene Material könnte von den der Suspension beigemischten Tensiden stammen, welche ursprünglich eine Hülle um die Partikel in der Suspension bildeten. In der Topographie-Abbildung wird dieser Bereich um die Partikel herum als abgelagerte Schicht sichtbar. Weiterhin zu erkennen sind einige tiefere Regionen, die wahrscheinlich den Probenträger zeigen.

Die Abbildung 3.3 zeigt eine perspektivische Darstellung eines großen abgebildeten Partikels aus einer Mischung von Mono-, Bi- und Triglyzeriden (Compritol). Die Schmelztemperatur dieser Substanz liegt über 60°C und liegt damit weit über der Umgebungstemperatur während des Abbildungs-

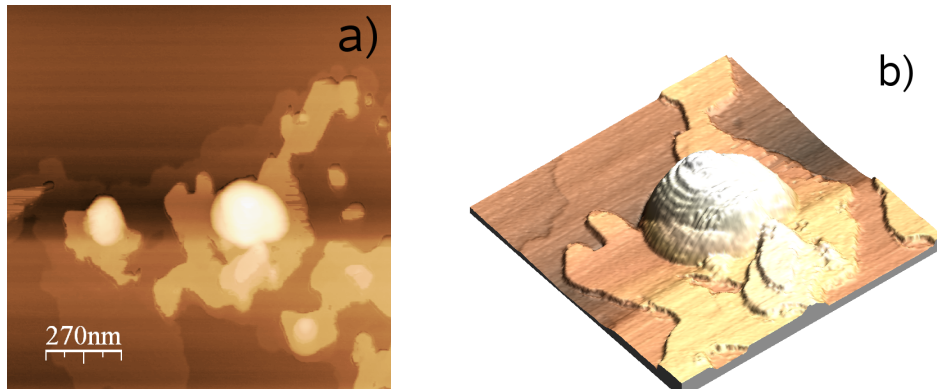


Abbildung 3.3: a) Topographie-Abbildung einer Mischung aus Mono-, Bi- und Triglyzeriden (Compritol) an Luft durch TM-AFM. Die Höhenskale beträgt ca. 75 nm. b) Die räumliche Darstellung der Topographie eines Ausschnitts aus der Abbildung zeigt eine Schichtanordnung der Glyzeride.

sprozesses. Die erkennbare treppenartige Struktur der abgebildeten Oberfläche zeigt damit die Schichtanordnung der Glyzeride, welche den Partikelkern bilden. Eine solche Schichtanordnung kann durch eine kristalline Anordnung der Glyzeride [90] während der Herstellungsphase begründet werden. Aber auch in dieser Darstellung wird eine Ablagerung um den Partikel herum sichtbar, deren Ursache ähnlich dem vorher gezeigten Beispiel sein wird.

Die beiden Beispiele zeigen, dass Untersuchungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop einen ergänzenden Beitrag zu Fragestellungen im Zusammenhang mit den untersuchten Partikeln liefern können. Eine direkte Untersuchung der Partikel in der Suspension, also der Umgebung, in der sie definiert sind, ist im allgemeinen Fall nicht durchführbar, da die Partikel vor einer Abbildung mit dem RKM auf einer möglichst ebenen Fläche zu immobilisieren sind. Dieses geschieht durch Trocknung einer Suspension auf einem Probenträger. Ähnlich wie bei Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop verändert der notwendige Trocknungsprozess die Morphologie der Proben.

Der Vorteil der Raster-Kraft-Mikroskopie liegt in der einfachen Weise der Probenaufbereitung und der Möglichkeit einer topographischen Visualisierung nach der Trocknung, welche Rückschlüsse auf den Aufbau der untersuchten Partikel zulässt.

Die Partikelsuspensionen, auch wenn sie nur aus wenigen Komponenten bestehen, erzeugen durch den Prozess der Trocknung eine hohe Variabilität an mit dem Raster-Kraft-Mikroskop abbildbaren Strukturen und erhaltenen Resultate deuten darauf hin, dass die Trocknung bei den SLN zu erheblichen Veränderungen führt. Für weitergehende systematische Studien, wie

der Wechselwirkung der Partikel mit Membranen, deutet sich damit die Notwendigkeit einer Modellierung einzelner Komponenten an. Das ist möglich, da eine Reihe von diskutierten Fragestellungen auch nicht notwendigerweise die Partikel als gesamte Einheit betreffen und vielmehr auch Fragestellungen hinsichtlich der Wirkungen der pharmazeutisch wirksamen Bestandteile oder der notwendigen Beimengungen (Tenside) bestehen.

### 3.3 Zellen

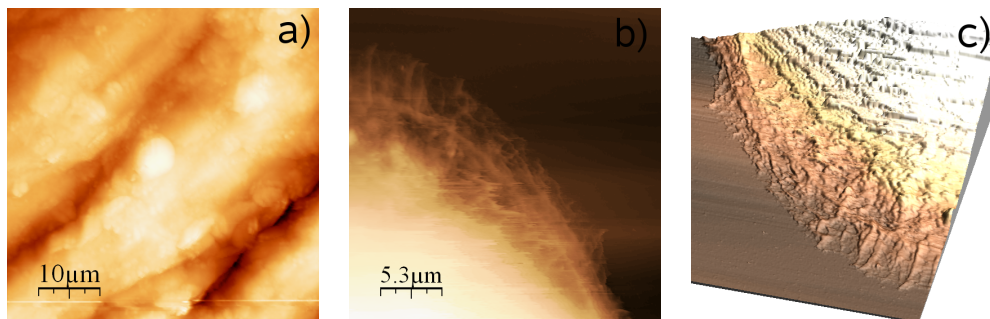


Abbildung 3.4: a) TM-AFM-Abbildung eines Hautpräparats (Schwein) an Luft. Die Höhenskale beträgt etwa  $5\text{ }\mu\text{m}$ . b) Topographie-Abbildung eines humanen Keratinozyten in Pufferlösung durch TM-AFM. Die Höhenskalierung des dargestellten Ausschnitts beträgt rund  $3\text{ }\mu\text{m}$ . c) räumliche Darstellung der Abbildung.

Das Raster-Kraft-Mikroskop ist ebenfalls für Abbildungen in Flüssigkeiten geeignet und ermöglicht damit auch die Abbildung von biologischen Zellen [23, 95] und eignet sich unter günstigen Bedingungen auch für die Messung mechanischer Eigenschaften der Membrane [96]. Aus dieser grundsätzlichen Sicht erscheint es möglich, Informationen über die Interaktion von Nanopartikeln oder membranwirksamer Stoffe mit den Zellmembranen in Pufferlösung durch Abbildungen zu erfassen.

Keratinozyten, also Hautzellen, sind für Untersuchungen mit dem RKM zugänglich, da sie auf festen Unterlagen kultivierbar sind oder als Präparate von Organismen gewonnen werden können, welche für die Abbildung an Luft aufbereitet werden können. Die Abbildung 3.4 zeigt für beide Varianten eine durch das RKM hergestellte topographische Abbildung von Hautzellen. 3.4a) zeigt einen Ausschnitt eines Hautpräparates an Luft und in 3.4b,c) wird eine in Nährlösung auf Glas kultivierte Zelle gezeigt. Die Abbildung an Luft zeigt die oberste Schicht der Haut und damit eine abgestorbene Zelle.

Biologische Zellen sind damit sowohl im abgestorbenen als auch im lebenden Zustand für die Abbildung mit dem RKM zugänglich. Aus den Abbildungen werden auch die Ausdehnungen der Objekte deutlich. In alle 3 Raumrichtungen liegen die Abmaße auf der  $\mu\text{m}$  Skale für das gesamte Objekt. Aber auch lokal zeigt eine lebende Zelle viele Strukturen.

Mit Hinblick auf die abschließenden Ausführungen aus dem vorangegangenen Abschnitt, ist auch hier abzuschätzen, ob die topographische Abbildung einzelner kompletter Zellen für eine systematische Untersuchung zur Wechselwirkung der in Zusammenhang mit den Partikeln wesentliche Informationen liefern kann, zumal die Wechselwirkungsmechanismen auf biologischen Membranen sehr komplex werden können [97] und damit eine sichere Interpretation erhaltener Kontraste erschwert wird.

Die durchgeführten Messungen haben gezeigt, dass reale biologische Systeme für Messungen mit dem RKM sehr groß sind und eine hohe Komplexität an Strukturen vorweisen. Eine differenzierte Untersuchung einzelner Interaktionen mit Partikeln oder Pharmaka wird dadurch verhindert. Wie auch in anderen Untersuchungen ist es daher notwendig, speziell für die Methodik des Raster-Kraft-Mikroskops und die gewünschten zu untersuchenden Interaktionen angepasste Modelle für die Zelle zu entwickeln. In ähnlicher Weise konnten an Modellen die Kräfte von Antikörperwechselwirkungen gemessen werden [17, 18]. Für das hier gestellte Problem wären wesentliche Eigenschaften der Zellmembrane für das RKM zu modellieren und dann für Experimente zu nutzen.



# Kapitel 4

## Modelloberflächen

### 4.1 Lipidmembranmodelle

Raster-Kraft-Mikroskopie-Untersuchungen wurden an biologischen Membranen und für Prozesse angestellt, welche mit ihnen verbunden sind. [98, 40] Um die Eigenschaften biologischer Membrane zu verstehen, ist es notwendig, ihre Grundstruktur, Lipidbilayer, zu studieren. Modellsysteme können die Aktivität der Membrane und Proteine hinsichtlich ihrer Funktion und Struktur [99] simulieren. Für die Entwicklung von Studien über das Verhalten von biologischen Membranen kann man Phospholipidmembran-Modelle benutzen [100, 101, 102, 103, 104, 105, 106]. Der Gebrauch von Modellmembranen, welche nur aus einer oder mehreren, aber einer kleinen Anzahl von Phospholipidkomponenten bestehen, hat den Vorteil der Vereinfachung [107, 108, 109, 110].

Das Studium an Modellmembranen erlaubt eine Bewertung von einzelnen Phänomenen an welchen die Phospholipide beteiligt sind. Danach können die durch Modelle erhaltenen Informationen benutzt werden, um das Wissen über die komplexeren Systeme, wie z.B. eine reale Zellmembran, zu vervollständigen.

Lipid-Monolayer und -Bilayer auf festen Trägern zogen ein beträchtliches Interesse in der Forschung im letzten Jahrzehnt auf sich. Diese Modelle wurden für Studien der Struktur und Eigenschaften natürlicher Membranen und für die Erforschung biologischer Prozesse [111, 112], einschließlich der molekularen Reorganisation, der Antigen/Antikörper-Wechselwirkung [112], der Enzymkatalyse und Membranfusion [106, 113, 114], Biosensoren [115], Biofunktionalisierung von anorganischen Festkörpern und der DNS-Immobilisierung [116] benutzt.

Lipidmembrane können in unterschiedlicher Weise auftreten und in der

Forschung genutzt werden. Für zahlreiche Experimente werden sie in Form von Vesikeln hergestellt und genutzt. Für Raster-Kraft-Mikroskop-Untersuchungen werden planare Lipidmembrane auf festen, ebenen Oberflächen präpariert. Die Stabilität, die Morphologie oder die Anordnung der Moleküle in diesen Filmen ist bis heute noch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, zu welchen das Raster-Kraft-Mikroskop einen kleinen Beitrag liefern kann. [117, 118] Membrane aus Phospholipiden können aber, auch als Modell für Zellmembrane dienen, wenn man sich für Vorgänge interessiert, die mit der Lipidmatrix der Zellmembrane verknüpft sind.

## 4.2 Das Phospholipid

Lipide sind Biomoleküle, welche in Wasser unlöslich und in organischen Lösungsmitteln sehr gut löslich sind. Eine wesentliche Beteiligung besitzen sie an der Speicherung von Energie im Organismus und an der Bildung der Zellmembranen.  $5 \times 10^6$  Lipidmoleküle bilden etwa  $1 \mu\text{m}^2$  einer Zellmembran [119]. Die drei prinzipiellen membranbildenden Lipidklassen sind Phospholipide, Glykolipide und Cholesterol. Alle Membranlipide haben eine strukturelle Gemeinsamkeit: Sie sind amphiphil; d.h. ein Ende des Moleküls ist hydrophob (praktisch nicht polar) und das andere Ende ist hydrophil (polar). Der Grad der Amphiphilität hängt von den strukturellen Details des Lipidmoleküls ab. [120, 121]

Eine Gruppe der Phospholipide wird durch Lipide mit einer Phosphocholin-Kopfgruppe, den Phosphatidylcholinen, gebildet. Bei einem derartigen Phospholipid (Abbildung 4.1) bindet die polare Phosphocholin-Kopfgruppe über eine Esther-Bindung an ein C-Atom aus dem Glyzerinrest. An die anderen zwei C-Atome des Glyzerinrestes binden ebenfalls über eine Esther-Bindung zwei Fettsäuren ( $R_1$ ,  $R_2$ ).

Während die Phosphocholin-Kopfgruppe und der Glyzerinrest für alle Phosphatidylcholine gemeinsam sind, sind die vorkommenden Fettsäuren variabel und bestimmen somit die physikalischen und chemischen Unterschiede zwischen den einzelnen Phosphatidylcholinen. Die Abbildung 4.1 zeigt das Phospholipid POPC. POPC ist dabei eine in der Praxis gebräuchte Abkürzung der Bezeichnung der Substanz, welche 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Phosphatidylcholin ist. Eine andere Möglichkeit der Bezeichnung ist 16:0-18:1 PC. Darin wird durch 16:0 eine Fettsäure mit 16 C-Atomen und ohne Doppelbindung (Palmitinsäure) beschrieben. 18:1 bezeichnet eine Fettsäure mit 18 C-Atomen mit einer Doppelbindung (Ölsäure). PC steht für Phosphatidylcholin, also für die Kopfgruppe.

Im lebenden Organismus kommen verschiedene Lipide aus der Gruppe

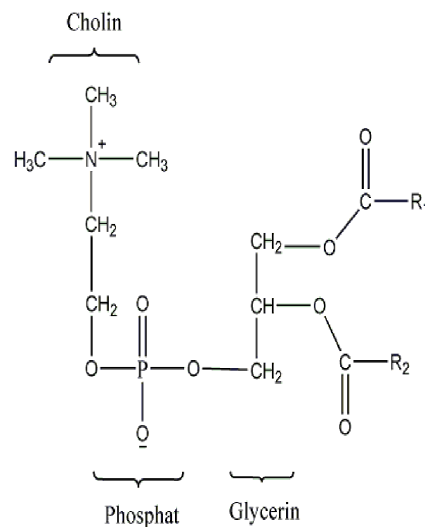


Abbildung 4.1: Die chemische Struktur des Phospholipids POPC als Beispiel für ein Lipid aus der Gruppe der Phosphatidylcholine. Dieses Phospholipid setzt sich aus der Kopfgruppe, welche aus dem Cholin und dem Phosphatrest gebildet wird, dem Glycerinrest und den zwei Fettsäuren  $R_1$  (Palmitinsäure) und  $R_2$  (Ölsäure) zusammen.

der Phosphatidylcholine vor (u.a. POPC), welche sich durch unterschiedlich lange CH-Ketten der Fettsäuren und der Anzahl der Doppelbindungen in diesen unterscheiden. Beobachtet werden Kettenlängen von 14 - 24 Kohlenstoffatomen mit bis zu 6 Doppelbindungen. Die daraus resultierenden unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der einzelnen Moleküle und deren Mischungen sind im Organismus mitverantwortlich für die hohe Variabilität des Lebens.

#### 4.2.1 Verwendete Phospholipide

Für die Auswahl der Lipide wurden unterschiedliche Kriterien berücksichtigt. Die Lipide sollen in einem Membranmodell für eine biologische Membran verwendet werden. Es sind daher Lipide auszuwählen, welche auch natürlicherweise vorkommen und in den Zellmembranen auch zu einem wesentlichen Bestandteil gehören. Das ist mit den Phospholipiden aus der Gruppe der Phosphatidylcholine erfüllt. [119] Weiterhin bestehen Zellmembranen aus Mischungen verschiedener Lipide und weiteren Bestandteilen (z.B. Proteinen). Im günstigen Fall sollte die Auswahl der Lipide auch Lipidmischungen zulassen. Die getroffene Auswahl der Lipide aus der Gruppe der Phosphatidylcholine ist in der Tabelle 4.1 zu finden.

Name	Struktur	Übergangstemperatur $T_m$ °C
DMPC	14:0	24
DPPC	16:0	41
POPC	16:0-18:1	-2,7
DOPC	18:1	-20
PC	–	–

Tabelle 4.1: Die für Untersuchungen verwendeten Phospholipide mit deren Struktureigenschaften und den Übergangstemperaturen  $T_m$  [122, 123, 124]. PC ist eine Mischung verschiedener Lipide und wird aus natürlichen Quellen gewonnen.

In der Auflistung ist auch PC enthalten. PC ist eine Mischung einer Zahl von Phosphatidylcholinen, welche aus dem Hühnerei gewonnen werden. Die Angabe einer Struktur oder einer Übergangstemperatur sind deswegen nicht sinnvoll.

Die Übergangstemperatur  $T_m$  ist ein im Zusammenhang mit dem Phasenübergang von Membranen, welche aus den jeweiligen Lipiden aufgebaut sind, definierter Begriff und hat ihren Ursprung in der Konfigurationsänderung der Moleküle in Abhängigkeit von der Temperatur.

#### 4.2.2 Membrane aus Phospholipiden

Phospholipide sind amphiphile Moleküle und können in polaren Flüssigkeiten wie Wasser sich in geordneten Strukturen organisieren. Eine Möglichkeit ist die Ausbildung von Bilayern, welche die Funktion einer Membran von Zellen übernehmen können. Die Lipide bilden eine Doppelschicht, den Bilayer, derart, dass die polaren hydrophilen Kopfgruppen nach außen und zum umgebenden wässrigen Medium weisen, während die aliphatischen hydrophoben Kohlenwasserstoffketten das Innere bilden [64]. Eine besondere Variante davon stellen planare Bilayer auf festen Trägern dar. Die Abbildung 4.2 zeigt ein Schema einer Anordnung von Lipidmolekülen auf einem festen Träger in wässriger Umgebung. Prinzipiell können alle der ausgewählten Lipide solche Bilayer bilden. Es ist ebenfalls möglich, ganze Stapel von Bilayern herzustellen, was bei Röntgendiffraktionsmessungen benutzt wird [125].

Die physikalischen Eigenschaften und die Stabilität der Filme, die durch die Bilayer gebildet werden, hängen von verschiedenen Faktoren ab. In Abhängigkeit von der Temperatur, können Bilayer, welche aus einem Lipid gebildet werden, sich in einer flüssig-kristallinen Phase ( $L_\alpha$ ) oder einer fest-kristallinen Phase ( $L_\beta$ ) befinden. Detaillierte Untersuchungen weisen beim

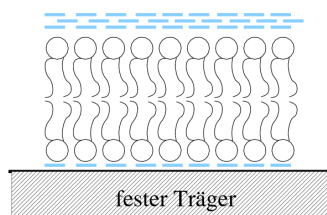


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung eines planaren Lipidbilayers auf einem hydrophilen festen Träger. Durch die Anwesenheit von Wasser organisieren sich die amphiphilen Lipide derart, dass möglichst nur die hydrophilen Kopfgruppen mit Wasser in Kontakt kommen.

Übergang in einem bestimmten Temperaturbereich auf eine weitere Phase, der sogenannten Ripple-Phase hin [126, 127, 128, 42]. In der fest-kristallinen Phase (Gel-Phase) befinden sich die Moleküle in einer relativ starren Anordnung zueinander, welche durch die van-der-Waals-Bindung zwischen den ausgerichteten Kohlenstoffketten dominiert wird [121, 129]. Die Ursache für den Übergang in die flüssig-kristalline Phase sind Fluktuationen (gauche-transformation) der Kohlenstoffketten bei höheren Temperaturen [123, 130]. Dieser Übergang erfolgt in der Region der Übergangstemperatur  $T_m$ , welche für die verschiedenen Lipide stark variiert. Diese Temperatur steigt mit der Anzahl der CH in den aliphatischen Ketten und sinkt mit der Anzahl der Doppelbindungen darin. Während des Übergangs ergeben sich Änderungen in der Organisation der Membran. Die Enthalpie erhöht sich abhängig von der Kettenlänge ungefähr um  $20\text{--}40\text{ kJmol}^{-1}$ , das Volumen um ca. 4 % und die Fläche um ca. 25 % [122, 45].

Unterschiedliche Phasen in Lipidbilayern, welche nur aus einer Komponente bestehen, können während der Erwärmung des System beobachtet werden, wenn die Temperatur des Systems in der Nähe der Übergangstemperatur  $T_m$  des betrachteten Phospholipids ist [45, 131]. Für DMPC wurde experimentell gezeigt, dass in einem Temperaturintervall während des Phasenübergangs die Gelphase und die flüssige Phase koexistieren können. Die Übergangstemperatur aus der Gel in die flüssige Phase liegt in einem Bereich zwischen  $20\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$  [132, 133], wobei die Temperatur graduell bis über den Phasenübergang erhöht wurde [101, 133].

Die Schichtdicke eines Bilayers ist abhängig vom Material und der Hydratation des Bilayers [134, 135, 105]. Die Materialabhängigkeit wird durch die unterschiedlich langen CH-Ketten evident. Untersuchungen haben aber ebenfalls darauf hingewiesen, dass die Hydratation des Bilayers eine entscheidende Rolle spielt, welche aber im Fall von RKM Messungen in Flüssigkeiten durch den Überschuss von Wasser gegeben ist. Messungen an Luft hingegen

werden nur unvollständig hydrierte Bilayer repräsentieren.

### 4.2.3 Phospholipidmischungen

Unter bestimmten Bedingungen von Temperatur und Druck, abhängig von ihrer Zusammensetzung, separieren sich Phospholipidmischungen in zwei nicht mischbare Phasen, von denen gegebenenfalls eine in der Gel-Phase ( $L_\beta$ ) und die andere in der flüssigen Phase ( $L_\alpha$ ) verbleibt. [109, 136, 137, 138, 139] Gleichwohl existieren immer noch offene Fragen in Verbindung mit der Mischbarkeit der Gel-Phase in der flüssigen Phase und umgekehrt. In einem Mischsystem aus Phospholipiden, d.h. einer Mischung aus zwei oder mehr Komponenten, ist das Auftreten von unterschiedlichen Phasen prinzipiell mit der Präsenz von unterschiedlichen Ketten der Fettsäuren (in einigen Fällen einfach oder mehrfach ungesättigt) verbunden. Für eine Mischung von Phospholipiden kann die Morphologie der Aggregate im Gel-Zustand in den Regionen der gel-flüssig Koexistenz kompakt oder verzweigt sein [110].

Lipidfilme sind als Modelle für biologische Membranen ausgiebig untersucht worden und haben viele Informationen über Lipid-Lipid Anordnungen und die Wechselwirkung mit Proteinen geliefert [136, 140, 141].

Untersuchungen über die Phasenseparation in Phospholipidfilmen haben sich als besonders nützlich für das Studium der Lipiddomänen gezeigt. Solche Domänen sind Regionen in der Membran, welche durch die Existenz der Phasenseparation auf Grund der Anwesenheit unterschiedlicher Lipidkomponenten gebildet werden. Ihre Größe kann einige Nanometer bis Mikrometer betragen [133, 142].

Lipiddomänen haben eine große biochemische Bedeutung, weil sie direkt an der Organisation der Proteine beteiligt sind [143]. Alles was die Anordnung dieser Domänen verändert, könnte auf diese Weise Veränderungen in der Funktion der Membran hervorrufen, da der funktionale Mechanismus auf dem Zusammenhang der Komponenten beruht.

## 4.3 Methoden der Herstellung der Modelloberfläche

Die Selbstorganisation der Monolayer, einfachen Bilayer und Multilayer aus Phospholipiden auf festen Trägern hat ein beachtliches Interesse verschiedener Forschungsrichtungen erhalten [98]. Strukturell sind die Phospholipidmembrane

stark an wässrige Umgebungen gebunden. Folgerichtig sind für biologisch re-

levante Untersuchungen an der Struktur der Lipidbilayer, ihrer Eigenschaften oder Wechselwirkungen physiologisch nahe Bedingungen einzuhalten.

Viele für das RKM geeignete Präparationsmethoden für Phospholipidmembranen wurden entwickelt. Unter ihnen sind die Vesikelfusion auf festen Trägern [102, 101, 109, 110, 113, 115], die elektrochemische Bildung von Bilayern [144], der Deposition mit Langmuir-Blodgett-Technik [145, 146, 147] oder mit Solution Spreading [148, 149, 150]. Diese Phospholipidmembrane als Modellsysteme sind auf festen Trägern deponierte Mono-, Bi- oder Multilayer von Phospholipiden.

Die Vesikelfusion und das Solution Spreading wurden für die Präparation der Modelloberflächen bezüglich der Verwendbarkeit eingehender untersucht. Beide Methoden bieten die Möglichkeit der Deposition von Bilayern und teilweise auch von Multilayern auf festen Trägern. Im Vergleich mit den weiteren zur Verfügung stehenden Methoden sind beide in der Handhabung reproduzierbar in einer kompakten Laborumgebung durchzuführen.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass sie für die Zielsetzung der Herstellung der gewünschten Modellmembranen geeignet sind. Die Vesikelfusion lässt sich in wässriger Umgebung gut für die Herstellung eines Bilayers verwenden, während das Solution Spreading ebenfalls die Herstellung von Multilayern zulässt. Multilayer können ebenfalls durch das Trocknen einer Vesikelsuspension erzielt werden. In Bezug auf Messungen mit dem RKM könnten Multilayer dazu beitragen, die Einbettung großer Moleküle (z.B. Proteine) zu untersuchen, welche durch die räumliche Nähe eines festen Trägers bei einem einfachen Bilayer beeinflusst werden könnte.

### 4.3.1 Vesikelfusion

Die Voraussetzung der Anwendung der Methode der Vesikelfusion zur Herstellung von Bilayern auf Trägern, ist die Verfügbarkeit von Vesikeln. Vesikel entstehen infolge einer Selbstorganisation von Lipiden, wie auch vielen anderen amphiphilen Molekülen, in wässriger Umgebung. Es sind Flächen von Bilayern welche ein Volumen einschließen. Dieses Volumen wird aus dem umgebenden Medium durch den Bilayer abgetrennt. Der Bilayer kann damit als Membran betrachtet werden. Die Bildung und die Eigenschaften der Vesikel sind ein Gegenstand vielseitiger Untersuchungen.

Die Herstellung der Vesikel kann durch verschiedene Methoden erfolgen. Im einfachsten Fall reicht ein Schütteln einer Suspension von Lipiden in Wasser mit einem Vortexer, um Vesikel herzustellen. Ebenso ist es denkbar, mittels Ultraschall die Bildung von Vesikeln in der Suspension zu erzielen. Beide Methoden ergeben multilamellare Vesikel, die nicht für alle Anwendungszwecke ausreichend sind. Mit Pressverfahren durch feinporige Membrane können

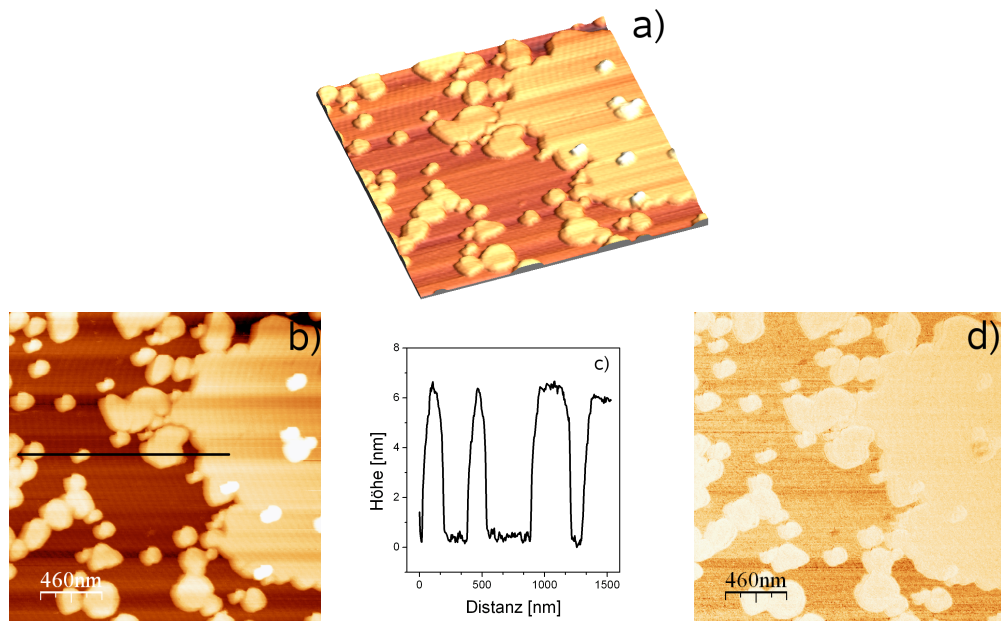


Abbildung 4.3: a,b) Formierung eines Bilayers auf einer Glimmeroberfläche durch Fusion von DPPC-Vesikeln. Die Abbildung mit TM-AFM erfolgte bei Raumtemperatur in Wasser. Zu sehen sind sowohl einzelne adhärenierte Vesikel oder Reste von diesen, als auch eine Fläche, welche durch einen kontinuierlichen Bilayer gebildet wird. Weiterhin gezeigt ist c) ein Linienplot, a) eine räumliche Animation der Abbildung und d) die Phasenkontrastabbildung, welche deutlich einen Kontrastunterschied zwischen dem Probenträger und der Lipidoberfläche zeigt.

auch unilamellare Vesikel in einer engen Größenverteilung produziert werden. Für die Herstellung von geträgerten Bilayern für Experimente mit dem Raster-Kraft-Mikroskop lassen sich alle diese Vesikel unabhängig von ihrer Herstellungsmethode verwenden.

Wird eine Vesikelsuspension in Kontakt mit einer Oberfläche gebracht, so kann es dazu kommen, dass ein Vesikel an der Oberfläche haften bleibt und platzt. Bei hinreichender Annäherung an eine Oberfläche wie gereinigtem Silizium, hydrophilisiertem Silizium oder frisch gspaltenem Glimmer gibt es offensichtlich eine schwache Interaktion des Bilayers mit der Trägersoberfläche. In der Raster-Kraft-Mikroskop-Abbildung 4.3 sind einzelne Vesikel zu erkennen, welche auf diese Weise zum Beginn einer vollständigen Bedeckung der Trägersoberfläche mit Lipidmaterial beitragen, welche sukzessive durch weitere Vesikel erfolgt.

Vor einer Abbildung mit dem RKM müssen überzählige Vesikel fortgewa-



schen werden, da sie den Lichtzeiger des Auslenkungsdetektors beeinflussen. Dieses muss sanft geschehen, da die Haftung der Lipidlayer an der Trägersoberfläche in den meisten Fällen nicht stark ist.

Die Abbildung 4.3 zeigt eine beginnende Formierung eines Lipid-Bilayers aus DPPC durch Vesikelfusion. Die Vesikel sind in Wasser hergestellt worden und die Glimmroberfläche, welche den festen Träger darstellt, eine Zeit bei einer Temperatur über der Übergangstemperatur von DPPC mit einer Vesikelsuspension benetzt worden. Der Vorgang wurde nach 1 h abgebrochen und nicht haftende überschüssige Vesikel vorsichtig gewaschen, wobei bis hin zur Abbildung mit dem Raster-Kraft-Mikroskop niemals das Wasser entfernt wurde. Die Abbildung der Oberfläche fand nach einer langsamen Abkühlung bei Raumtemperatur statt. Im Ergebnis zu sehen sind einige kleine Inseln, welche durch die Anhaftung eines Vesikels gebildet wurden. Daneben ist ein größerer Bereich erkennbar, der eine durch einen Bilayer gebildete geschlossene Fläche darstellt. Die Höhendifferenz von etwa 6 nm gibt ein deutliches Indiz auf das Vorhandensein eines Bilayers aus DPPC. Ein weiteres Indiz für diese Interpretation ist durch die gemessene Phasenverschiebung (Abbildung 4.3d)) im TM-AFM gerechtfertigt. Der unterschiedliche Kontrast deutet auf eine veränderte Wechselwirkungsmechanik in der Abbildung hin, die in diesem einfachen System aus nur zwei Komponenten nur durch das Vorhandensein eines anderen Stoffes, des DPPC, interpretiert werden kann und in wässriger Umgebung sich nur Bilayer oder vielfache davon ausbilden können.

Die Eigenschaften eines Lipidbilayers sind, wie bereits an anderer Stelle erwähnt, abhängig von chemischen Eigenschaften des Mediums das sie umgibt und mindestens weiterhin temperaturabhängig. Die Wahl des Mediums ist häufig an experimentelle Fragestellungen gebunden und es kommen damit neben Wasser auch verschiedene Pufferlösungen in Frage. Die Temperatur, bei der die Vesikel hergestellt und verarbeitet werden und sollte während des Umgangs mit den Vesikeln über der Übergangstemperatur der verwendeten Lipide liegen, so dass man davon ausgehen kann, dass sich die Bilayer im flüssigen Zustand befinden. Im Fall von DPPC wären das Temperaturen von über 41°C.

In Abhängigkeit von der Fragestellung könnte eine Abbildung mit dem RKM auch bei geringeren Temperaturen vorgenommen werden. Die gezeigten Abbildungen sind bei Raumtemperatur hergestellt worden.

Eine Variante der Methode der Vesikelfusion ergibt sich durch Trocknung einer Vesikelsuspension auf einer Oberfläche. Der Entzug von Wasser führt zu einer Immobilisierung der Vesikel auf der Oberfläche und schrittweise in Abhängigkeit von der Menge der Lipide in der angewendeten Suspension zur Ausbildung von Lipid-Multilayern. Die Abbildung 4.4 zeigt einen auf diese Weise erzeugten Multilayer, welcher durch Trocknung einer Suspension aus

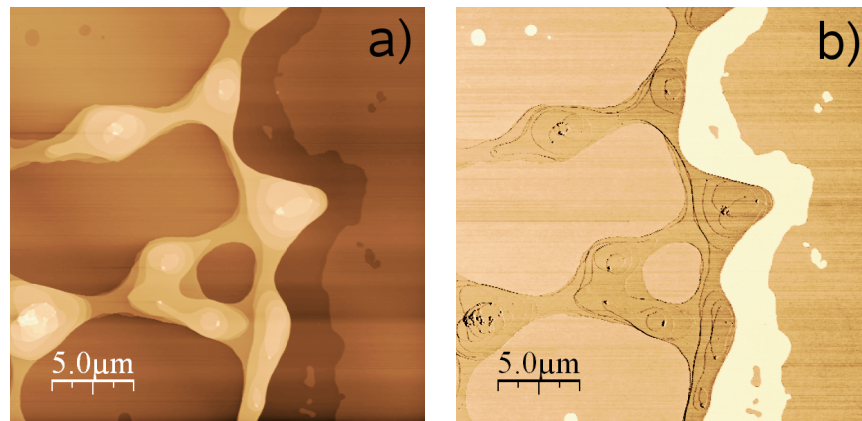


Abbildung 4.4: a) Raster-Kraft-Mikroskop-Abbildung eines DMPC-Multilayers auf einer Glimmeroberfläche an Luft. Die hellen Anteile in der Phasenabbildung b) deuten darauf hin, dass auch Teile der Glimmeroberfläche abgebildet worden sind.

DMPC Vesikeln auf Glimmer entstanden ist.

In der Abbildung 4.4a) wird ein fast komplett ausgebildeter Bilayer sichtbar, in dem einige Inseln eingelagert sind, die durch Multilayerschichten gebildet werden. Die Phasenkontrastaufnahme 4.4b) zeigt einen hellen Streifen, der mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Oberfläche des festen Trägers hervorgerufen wird und korreliert mit den tiefsten Stellen in der Abbildung 4.4a). Der schwache Kontrastunterschied in der Phase zwischen den Regionen, welche durch einen Bilayer gebildet werden und den Regionen, welche durch Multilayer gebildet werden, deuten an, dass der erste Bilayer sich mechanisch gegenüber den anderen auszeichnet oder aber die Abbildung noch durch die Wechselwirkung zwischen Spitze und Trägeroberfläche beeinflusst wird.

Die Herstellung von Lipidbilayern durch die Trocknung der Suspension ist weitgehend auf Suspensionen beschränkt, welche keine oder nur wenig gelöste Salze besitzen, welche z.B. aus Pufferlösungen stammen könnten. Solche Beimengungen kristallisieren während der Trocknung aus und können störend bei der Abbildung mit dem Raster-Kraft-Mikroskop wirken.

Oberflächen, die in der beschriebenen Art hergestellt wurden, können direkt mit dem Raster-Kraft-Mikroskop an Luft abgebildet werden. Für Untersuchungen in Flüssigkeiten müssen die Lipidlayer erneut mit Flüssigkeit benetzt werden. Der Prozess der Hydratation und die damit verbundenen Fragen werden im Zusammenhang mit dem Solution Spreading behandelt.

### 4.3.2 Solution Spreading

Die Methode des Solution Spreading auf festen Oberflächen wurde als effiziente und praktische Methode angewendet, um homogene und Substrat ausgerichtete dünne organische Filme herzustellen. Unter geeigneten Bedingungen erhält man mit dieser Methode parallel zur Oberfläche ausgerichtete Filme, die wenige Defekte und eine gut definierte Schichtdicke aufweisen [148].

Multilayer, welche mit dieser Methode hergestellt wurden, wurden für unterschiedliche Untersuchungen, wie z.B. Röntgendiffraktometrie, Elektronenmikroskopie, Ellipsometrie oder RKM-Messungen an Luft [108] verwendet und die Ergebnisse zeigen, dass die hergestellten Filme eine hohe Qualität besitzen.

Für diese Arbeit wurden ausgerichtete Lipidbilayer verschiedener Phospholipide durch diese Methode hergestellt und deren Morphologie, Stabilität sowie deren Verwendbarkeit für die Raster-Kraft-Mikroskopie in Flüssigkeiten untersucht [149].

Alle verwendeten Phospholipide lösen sich in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Isopropanol. Die Lipide können in diesen Lösungsmitteln gelöst aufbewahrt und gehandhabt werden und für den Auftrag einer bestimmten Menge eines Lipids wird ein definiertes Volumen einer solchen Lösung auf die gewünschte Oberfläche aufgebracht. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels verbleiben die Lipide auf der Oberfläche.

Dieser Vorgang ist hinsichtlich des verwendeten Lösungsmittels in Bezug auf die zu beschichtende Oberfläche kritisch. Auf hydrophilen Oberflächen wie hydrophilem Silizium [134, 151, 152] und Glimmer [153] wurden gute Ergebnisse mit reinem Isopropanol oder einer Mischung von Isopropanol und Ethanol (50/50 vol%) erzielt, da diese Flüssigkeiten die Oberfläche benetzen. Ein leichter Luftstrom unterstützt das gleichmäßige Verdampfen des Lösungsmittels. Versuche mit Chloroform waren auf hydrophilen Trägeroberflächen hinsichtlich der erzielten Resultate weniger erfolgreich, da das Chloroform die Oberfläche nicht vollständig benetzt und es dadurch zu einer ungleichmäßigen, lokalen Anhäufung von Lipidmaterial kommt.

Während des Verdampfens des Lösungsmittels kommt es gleichzeitig zu mehr oder weniger vollständigen Ausbildung einer Bilayerstruktur der Lipide. Über das anfängliche Filmwachstum gibt es bis jetzt nicht viele Kenntnisse [149]. Die Experimente zeigen aber, dass die Herstellung von Bilayern und Multilayern möglich ist. Die Morphologie der erhaltenen Filme besitzt wahrscheinlich einen Zusammenhang mit der Übergangstemperatur des Lipids. Je geringer die flüssig-gelphasen Übergangstemperatur des verwendeten Lipids war, je ausgedehnter und homogener waren die zu beobachtenden multilamellaren Oberflächenstrukturen. Bei Raumtemperatur weniger homoge-

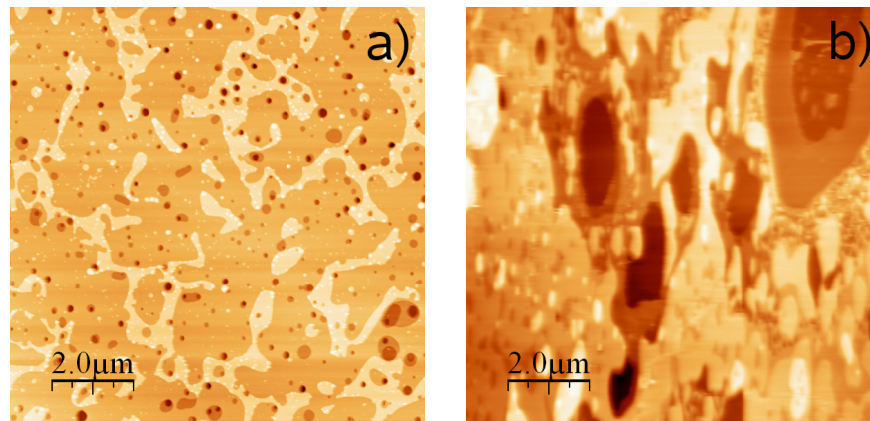


Abbildung 4.5: TM-AFM Abbildungen zweier Multilayer an Luft, welche durch Solution Spreading hergestellt wurden. a) zeigt einen DMPC Multilayer und b) einen Multilayer aus DPPC. Beide Multilayer sind unmittelbar nach dem Verdampfen des organischen Lösungsmittels abgebildet worden.

ne Strukturen aus Lipiden einer hohen Übergangstemperatur (z.B. DPPC) ließen sich nachträglich durch die Anwendung von Wärme und gesättigter Wasserdampfatosphäre verbessern, wie weiter unten ausgeführt wird. Die Wasserdampfatosphäre deutet darauf hin, dass an der Bildung der Bilayer während des Verdampfens der Lösung das sich in der Regel immer auf hydrophilen Oberflächen unter Umgebungsbedingungen befindende Wasser eine wesentliche Rolle spielt.

Die Abbildung 4.5 zeigt zwei RKM-Abbildungen von Oberflächen die durch DPPC und DMPC gebildet werden. Aus der Tabelle 4.1 auf Seite 42 kann entnommen werden, dass DMPC gegenüber DPPC eine geringere Übergangstemperatur besitzt. Die Strukturen der DMPC-Oberfläche in der Abbildung 4.5b) sind wesentlich ausgedehnter und geordneter als im Vergleich mit denen des DPPC, Abbildung 4.5a).

In vielen Fällen besteht ein Interesse, Bilayer herzustellen, die aus einer Mischung verschiedener Lipiden bestehen. Das Solution Spreading wurde auch mit Mischungen aus in der Tabelle 4.1 aufgeführten Phospholipiden angewendet. Wie in der Abbildung 4.6 zu sehen, werden auch im Fall von Lipidmischungen Multilayerstrukturen erzielt. Zu sehen ist in dieser RKM-Abbildung neben der Topographie, Abbildung 4.6a), auch eine Phasenkontrastaufnahme, Abbildung 4.6b), nach welcher die abgebildete Probe aus einer Mischung aus DPPC und POPC hauptsächlich zwei verschiedene Kontrastbereiche zeigt. Auch wenn Proben, die durch Solution Spreading hergestellt worden sind, bei Abbildungen an Luft nur partiell hydriert sein werden, zeigen sie offensichtlich schon eine räumliche Separation der Lipide, welche

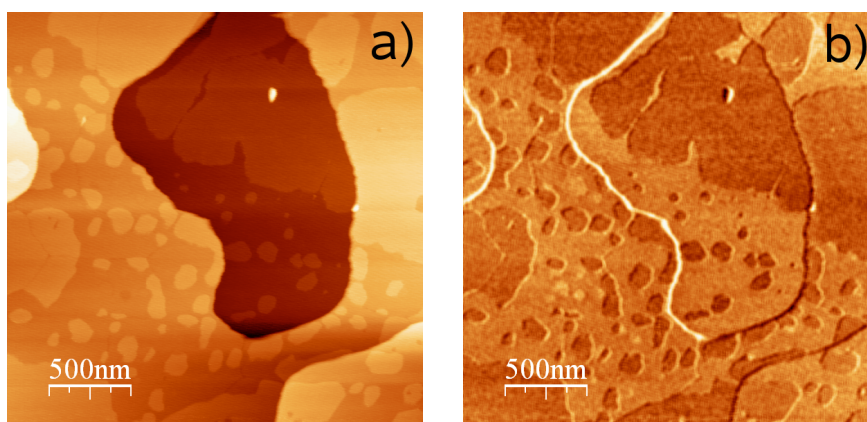


Abbildung 4.6: a) Topographieabbildung eines DPPC/POPC Multilayers an Luft (TM-AFM), welcher durch Solution Spreading hergestellt wurde. b) Die Phasenkontrastabbildung deutet darauf hin, dass die gebildeten Bilayer phasensepariert sind.

im Fall der hier verwendeten Lipide gleichzeitig einer Separation in Gelphase und flüssiger Phase entspricht, wie sie bei Systemen unter vollständig hydrierten Bedingungen aus diesen zwei Substanzen beobachtet werden kann. Der gemessene Phasenkontrastunterschied, welcher durch eine unterschiedliche Wechselwirkungsmechanik erklärt werden kann, korreliert mit den gemessenen Höhenunterschieden (ca. 1 nm) innerhalb der erhaltenen Bilayer. In dieser Interpretation entsprächen Bereiche in der dunkleren Farbe dem Vorkommen eines DPPC reichen Gel-Zustandes.

Durch Solution Spreading an Luft hergestellte Lipidfilme sind unter Umgebungsbedingungen nicht vollständig hydriert. Sie geben daher, anders als Vesikel und deren daraus in wässriger Umgebung hergestellten Lipidlayer, unmittelbar nach ihrer Herstellung nur teilweise Eigenschaften natürlicher Lipidmembrane wieder. Vor einer Verwendung als Membranmodell wären die Eigenschaften der durch Solution Spreading hergestellten Filme unter vollständig hydrierten Bedingungen in Flüssigkeiten zu untersuchen. Aus [154] ist bekannt, dass für durch Solution Spreading hergestellte Filmen, welche nachträglich vollständig hydriert wurden, die bekannten Schichtebenenabstände gemessen wurden und sich strukturell nicht von anders hergestellten Filmen unterscheiden.

Andere Aspekte sind die erzielbare zeitliche Stabilität der Lipidfilme und die Stabilität während des Benetzens mit einer wässrigen Lösung. Zur Zeitstabilität wurde durch Röntgenreflektometrie [151] an DMPC gezeigt, dass sich bis auf den ersten Bilayer alle Multilayer nahe bei der Übergangstemperatur von der jeweiligen Unterlage lösen. Die Stabilität der durch Solution Sprea-

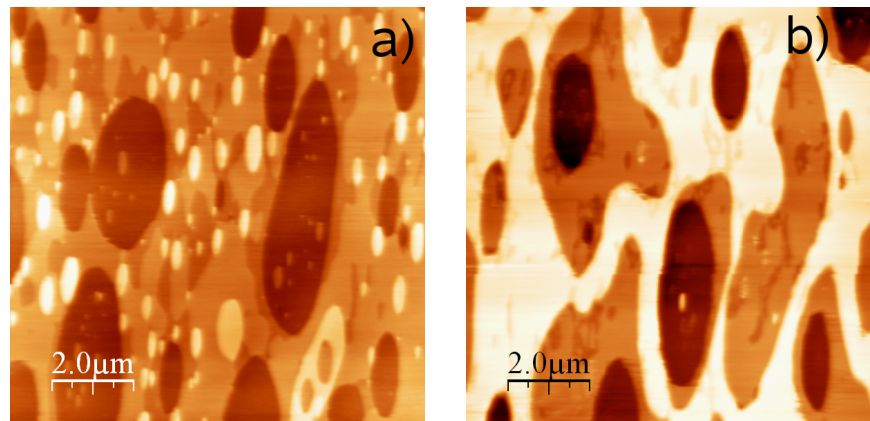


Abbildung 4.7: Die Abbildung zeigt einen durch Solution Spreading hergestellten DPPC Multilayer, welcher a) 20 min und b) 30 min sich bei einer Temperatur von über 40 °C in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre befunden hat. Deutlich zu sehen ist eine Umordnung des Multilayers und eine Zunahme der Ausdehnung der Strukturen.

ding hergestellten Multilayer wird demnach zwischen den Lipidmischungen verschieden sein, da Lipide mit sich stark unterscheidenden Übergangstemperaturen verwendet wurden.

Dass Hydratation der Lipidfilme eine starke Umordnung der Morphologie der Filme hervorrufen kann, wird durch ein Experiment in Wasserdampf-atmosphäre verdeutlicht. Ein durch Solution Spreading hergestellter DPPC-Film wird einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre bei ca. 40°C eine Zeit lang ausgesetzt (in den Abbildungen sind 30 min dokumentiert) [149]. Zwei Etappen dieser Behandlung sind in der Abbildung 4.7 zu sehen und zeigen eine deutliche Neuordnung des deponierten Materials. Nach 30 min sind aus den vielen kleinen Strukturen und Inseln, wie sie in Bild 4.7a) zu erkennen sind, lamellare Strukturen und größere Terrassen entstanden. Das topographische Profil in Bild 4.7b), bestätigt die Bildung von weiten Multilayerstrukturen für die DPPC Probe nach 30 min der Wasserdampfexposition. Die gemessene Dicke der Bilayer beträgt 5–6 nm, was in etwa mit den Werten für hydrierte DPPC-Bilayer übereinstimmt.

Unabhängig von der gewählten Herstellungsmethode der Lipidfilme erfordert die Anwendbarkeit der Filme für „in-situ“ Experimente, also Experimente in Flüssigkeiten, die Benetzung der Proben mit Flüssigkeit.

Die in der Flüssigkeitszelle des Raster-Kraft-Mikroskops montierten Proben wurden dafür vorsichtig mit 100–500  $\mu$ l Wasser oder Pufferlösung bei Raumtemperatur überschichtet. Nach der Justage des RKM, ein Vorgang, der 15–30 min dauert, wurden die Lipidfilme zur Untersuchung ihrer Mor-



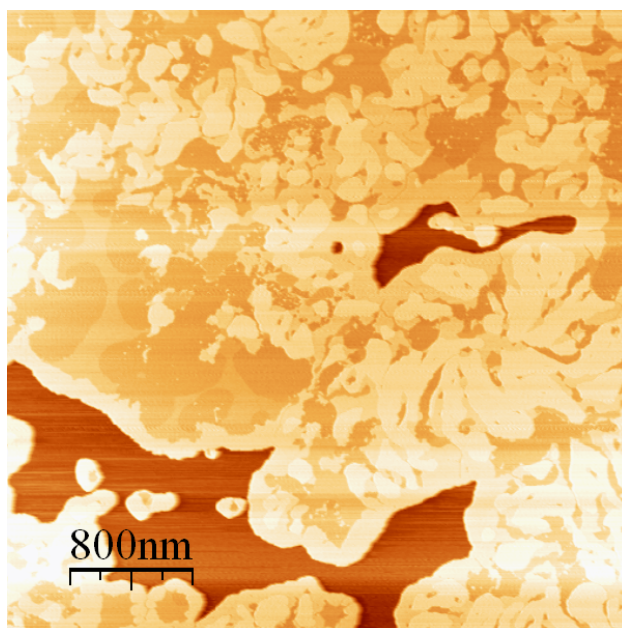


Abbildung 4.8: Topographische Abbildung im MAC-Modus eines DPPC/PC Bilayers, welcher durch Solution Spreading hergestellt worden ist, in Wasser. Zu erkennen ist die Glimmeroberfläche und ein Bilayer, der eine Phasenseparation der verschiedenen Lipide zeigt (PC ist eine Mischung einer Anzahl verschiedener Lipide).

phologie abgebildet. Die Abbildung der Strukturen in Flüssigkeiten selber erfolgte in fast allen Fällen in einem dynamischen Modus (MAC-Mode), um Modifikation der Oberfläche zu vermeiden.

Verschiedene Systeme aus den in der Tabelle 4.1 genannten Phospholipiden sind in dieser Weise hinsichtlich ihrer Morphologie nach der Benetzung untersucht worden. DPPC zeigt nach der Benetzung die typische Multilayer-Struktur, die sehr ähnlich der in Abbildung 4.7b) gezeigten Strukturen aussehen. Mit DMPC lassen sich auch Multilayer erzeugen, wobei im Unterschied zum DPPC der oberste Bilayer fast komplett mit wenigen Defekten erscheint. Bilayer, welche aus Mischungen von DPPC mit POPC, DOPC oder PC hergestellt worden sind, weisen nach dem Benetzen mit Wasser oder Puffer den stärksten Umbau auf. Filme aus reinem POPC, DOPC oder PC, welche nach der Benetzung stabil waren, konnten nicht hergestellt werden.

Eine RKM-Abbildung einer primären Mischung aus gleichen Masseanteilen DPPC/PC zeigt die Abbildung 4.8. In der Topographie-Abbildung kann man einen fast kompletten Bilayer erkennen. Ein wesentlicher Teil der Lipide wurde offensichtlich durch den Benetzungsvorgang entfernt, so dass keine

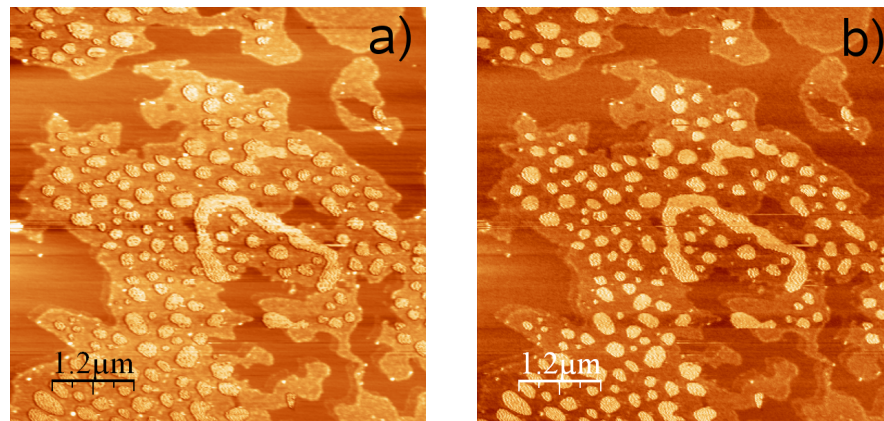


Abbildung 4.9: RKM-Abbildung eines Phospholipidfilms aus einer Mischung bestehend aus DPPC/DOPC in HEPES-Puffer im MAC-Modus. a) Topographie des Bilayers, b) Phasenkontrast. Der Phasenkontrast zeigt drei Kontrastbereiche, welche mit den Höhenabstufungen in der Topographie korrespondieren.

Multilayer-Struktur erhalten geblieben ist, die auch für die Phospholipidmischungen an Luft typisch sind.

Zu sehen ist ein Bilayer, der die Trägeroberfläche nur partiell bedeckt, so dass auch der abgebildete Träger selber sichtbar ist. Die Struktur des Bilayers ist inhomogen und man erkennt ähnlich wie in Abbildung 4.6 DPPC reiche Bereiche, die sich im Gel-Zustand befinden.

PC enthält weiterhin eine Anzahl weiterer Phospholipide mit kurzen Fettsäureketten, welche zum Teil ungesättigt sind. Es ist daher anzunehmen, dass alle weiteren Phospholipide sich im flüssigen Zustand befinden und die etwas flacheren Strukturen im Bilayer bilden. Es sind wesentlich mehr Höhenstufungen als bei binären Mischungen, wie die im Folgenden betrachteten Mischungen aus DPPC/DOPC und DPPC/POPC zeigen, festzustellen, was eine Folge der räumlichen Separation der Phospholipide mit unterschiedlichen Fettsäuren sein wird. Eine Domänenbildung sollte allgemein zwischen Phosphatidylcholinen mit unterschiedlichen Fettsäuren unabhängig einer Gel-Flüssigphasenseparation zu beobachten sein.

Die Interpretation des Auftretens einer separierten Gel- und Flüssigphase, die mit einer Höhenstufung korreliert, kann durch den Signalphasenkontrast im dynamischen Modus unterstützt werden. Am Beispiel einer binären Mischung aus DPPC/DOPC ist das in der Abbildung 4.9 gezeigt. Der abgebildete Bilayer wurde durch Solution Spreading und Benetzen mit HEPES-Puffer bei Raumtemperatur aus einer Mischung aus gleichen Masseanteilen DPPC und DOPC hergestellt. Zu sehen ist in der Abbildung 4.9a) die im MAC-



Modus gemessene Topographie eines Ausschnitts der Probe, wobei sich drei charakteristische Bereiche zeigen. Der dunkelste und damit tiefste Bereich kann dem Träger zugeordnet werden. Die anderen beiden Höhenstufungen stellen den verbliebenen Lipidbilayer dar, wobei der erzielte Signalphasenkontrast, Abbildung 4.9b), darauf hindeutet, dass es sich um zwei verschiedenen verhaltende Materialien handelt. DPPC-reiche Bilayer im Gel-Zustand sind ein wenig höher als die DOPC-reichen Bilayer im flüssig-kristallinen Zustand.

Gel-Zustand und flüssig-kristalliner Zustand eines Lipidbilayers aus den verwendeten Bilayern können durch die Höhenunterschiede innerhalb des Bilayers und im günstigen Fall durch die Signalphase unterschieden werden. Der Signalphasenkontrast wird aussagekräftiger, je mehr Interaktion mit der Probenoberfläche durch die Abbildungsparameter gefordert wird. Eine möglichst Oberflächen schonende Abbildung reduziert den erhaltenen Phasenkontrast, wobei eine Interpretation des vorliegenden Phasenzustandes über die Höhenunterschiede innerhalb der Bilayer möglich bleibt.

Das DPPC übernimmt bei Raumtemperatur eine Stabilisierung von Lipiden, welche bei dieser Temperatur Bilayer im flüssig-kristallinen Zustand bilden, auf der Oberfläche des Trägers und ermöglicht auf diese Weise die Herstellung von gemischtphasigen Phospholipidfilmen auf festen Trägern durch Solution Spreading. Diese Filme sind ebenfalls für Untersuchungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop in Flüssigkeiten geeignet.

## 4.4 Modell-Lipidlayer hergestellt durch Solution Spreading

Stabile Lipidfilme, die zudem aus unterschiedlichen Phospholipiden und Lipidphasen bestehen können, konnten für Untersuchungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop in Flüssigkeiten wie Wasser oder Pufferlösungen durch Solution Spreading hergestellt werden. Es bietet sich damit an, diese effizient herzustellenden Filme als Modellsysteme für biologische Membrane für Raster-Kraft-Mikroskopie-Untersuchungen zu benutzen.

Eine reale biologische Membran ist ein hochkomplexes Gebilde aus vielen Komponenten, von dem durch einen Lipid-Bilayer nur ein kleiner Teil modelliert wird. Aber dieses Modell ist ein Ansatz, der mit dem RKM untersucht werden kann und welcher die Möglichkeit eröffnet, Veränderungen an der Modellmembran durch aktive Substanzen sichtbar werden zu lassen und diese Prozesse durch topographische Änderungen während des Verlaufs zu visualisieren.

Eine Lipidmischung aus DPPC/POPC zu gleichen Masseteilen im Aus-

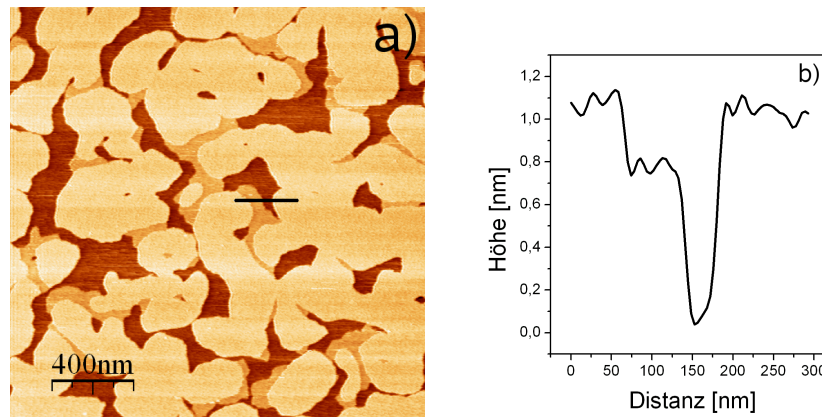


Abbildung 4.10: a) Topographieabbildung eines DPPC/POPC in Wasser im MAC-Modus. Der Lipidfilm wurde durch Solution Spreading hergestellt und nach dem Benetzen mit Wasser abgebildet. b) Der Linienplot zeigt eine charakteristische Höhendifferenz für einen phasenseparierten Bilayer. Die tieferen Abschnitte werden durch POPC reiche Regionen im flüssigen Zustand gebildet. Die höchsten Abschnitte stellen DPPC reiche Regionen im Gelzustand dar.

gangsmaterial wurde als Modellmembran ausgewählt. Eine Mischung aus diesen Lipiden ergibt nach der beschriebenen Behandlung auf Glimmer einen Bilayer mit einer auftretenden Phasenseparation der Lipide. Die Abbildung 4.10a) zeigt die Topographie einer solchen Oberfläche. Zu sehen ist dort ein im MAC-Modus abgebildeter Bilayer, der eine Phasenseparation aufweist. Die Phasenseparation wird hier durch die gemessenen Höhendifferenzen innerhalb des Bilayers sichtbar (Abbildung 4.10b)). Es treten zwei Höhendifferenzen auf, wobei die größte Differenz mit ca. 1,1–1,2 nm deutlich geringer als ein Schichtabstand eines Bilayers ist und die zweite Differenz nur 0,3–0,4 nm aufweist.

Aufgrund der Zusammensetzung des Filmes ist davon auszugehen, dass der höchste abgebildete Teil des Bilayers durch DPPC im Gel-Zustand gebildet wird. Die tiefsten Stellen werden durch einen Bilayer im flüssig-kristallinen Zustand aus POPC gebildet. Die dazwischen liegenden Abschnitte könnten einen asymmetrischen Bilayer oder eine Mischung aus beiden Lipiden darstellen. Eine schematische Darstellung einer Anordnung eines Bilayers aus einer Mischung von Phosphatidylcholinen in der flüssig-kristallinen und Gel-Phase zeigt die Abbildung 4.11. Die relativen Flächenanteile dieser gefundenen topographischen Merkmale sind an einzelnen Orten der Probenoberfläche variabel.

Die Morphologie der hergestellten Filme ist mindestens über 2 h stabil.

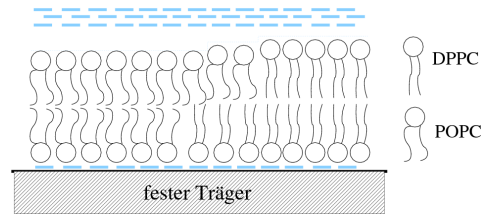


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Anordnung einer Lipidmischung in einem Bilayer. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Acylketten der Lipide kommt es zu einer Phasenseparation innerhalb des Bilayers. DPPC bildet bei Raumtemperatur Bilayer im Gelzustand; POPC hingegen bildet Bilayer im flüssigen Zustand.

Über diesen Zeitraum hinweg wurden von verschiedenen hergestellten Filmen Sequenzen von Oberflächenabbildungen hergestellt, welche keine substantziellen Änderungen ergaben. Der Zeitraum ist begrenzt durch Scannerdrift des RKM.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Stabilität des Filmes gegenüber kleinen Temperaturschwankungen des Systems, denn durch die weitgehend offene Konstruktion des RKM ist eine leichte Erwärmung oder Abkühlung der Messkopfes während des Betriebes möglich. Die Übergangstemperaturen der ausgewählten Materialien DPPC und POPC sind weit entfernt von der Umgebungstemperatur des RKM, welche im Regelfall bei 21–24 °C lag. Auch kleine Temperaturänderungen in diesem Bereich führen noch nicht zu einer deutlichen Annäherung an die jeweiligen Übergangstemperaturen, so dass noch keine wesentlichen Morphologieänderungen durch Temperatureffekte zu erwarten sind und auch nicht gefunden wurden, während für reine DMPC Systeme in diesem Bereich ein Phasenübergang liegt und in diesem Bereich die Morphologie stark temperaturabhängig ist [45].

Hergestellte DPPC/POPC Bilayer wurden ausgewählt, um bei Raumtemperatur Experimente mit dem Raster-Kraft-Mikroskop durchzuführen, bei welchen Topographieveränderungen durch die Wechselwirkung der Bilayer mit verschiedenen Substanzen beobachtet werden sollten. Es wurden Substanzen ausgewählt, die einen Zusammenhang mit den in Kapitel 3 betrachteten Objekten und Fragestellungen haben.

Die topografischen Veränderungen an den Modellmembranen infolge der Wechselwirkungen mit einer Lipidpartikelsuspension (NLC), einem zur Herstellung der Partikelsuspensionen verwendeten Tensid (Poloxamer188) und drei Modellpeptiden (A2P, KLA1, MK5e) wurden gemessen. Die Auswahl dieser unterschiedlich komplexen Systeme bietet eine Möglichkeit, den Nutzen der Methode der Raster-Kraft-Mikroskopie für die jeweiligen Fragestel-

lungen zu bewerten.

Partikelsuspensionen, wie sie im pharmazeutischen Hintergrund verwendet werden, sind eine Mischung aus vielen Komponenten. Deren lipidartige Partikel bestehen durch den Herstellungsprozess bedingt aus Mischungen verschiedener Glyzeride, Tensiden und gegebenenfalls pharmazeutisch wirksamer Substanzen. Glyzeride und Tenside können mit Lipidmembranen grundsätzlich interagieren. Von daher wurde die Wechselwirkung des Glyzerid/Tensid-Systems und die der Tenside allein betrachtet.

Die drei untersuchten Peptide sind Modellpeptide, deren Membranaktivität durch andere Methoden gesichert ist [155, 156]. Das Raster-Kraft-Mikroskop bietet die Möglichkeit, die Veränderung der Membran über die Veränderung der Topographie zu studieren.

Für die Beobachtung der Wechselwirkung mit den Testsubstanzen wurden zunächst Lipidmembrane durch Solution Spreading hergesellt, wie es in diesem Abschnitt beschrieben ist. Nach der Montage des Glimmerplättchens im RKM wurde der Lipidfilm darauf mit Wasser benetzt (ca. 500  $\mu\text{l}$ ) und anschließend durch eine Abbildung mit dem RKM charakterisiert.

Im Anschluss an die Auswahl einer geeigneten Stelle auf der Oberfläche und einer Wartezeit (15–30 min), die der thermischen Equilibration des Mikroskops und der Probe dient, werden zunächst einige Scans der Oberfläche durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Topographie des Systems keinen signifikanten Änderungen durch den Scan erfährt. Durch den in Flüssigkeiten sehr gut arbeitenden MAC-Modus [30] und die günstige Wahl der Abbildungsparameter wird dies in der Regel gewährleistet. Eine Oberfläche, ähnlich wie sie in Abbildung 4.10 gezeigt ist, stellt damit die Ausgangssituation des jeweiligen Experiments dar.

Während eines Scans werden zu einem Zeitpunkt (in der Regel unmittelbar nach Beginn) die Testsubstanzen in einer wässrigen Lösung hinzugefügt (jeweils ca. 50  $\mu\text{l}$ ). Damit kann eine Änderung der Topographie durch den Wechselwirkungsprozess ab dem Moment des Hinzufügens der Testsubstanz zeitlich verfolgt werden. Da eine Abbildung mit dem Raster-Kraft-Mikroskop in Flüssigkeiten einige Minuten dauert, werden die topografischen Veränderungen durch Prozesse, welche in einer ähnlichen oder langsameren Skala verlaufen, in ihrem Fortschreiten sichtbar. Eine einzelne Abbildung zeigt immer Regionen der Modellmembranen, die unterschiedlich lange der Testsubstanz ausgesetzt waren. Nach einem Zeitraum kann der Prozess zu einem Stillstand kommen. In diesem Fall, genauso wie im Fall einer im Vergleich zur Abbildungszeit sehr schnellen Interaktion, werden wiederholte Scans mit dem RKM zu ähnlichen Abbildungen führen.

Untersuchungen an Modellmembranen könnten auf diese Weise theoretisch über viele Stunden Topographieabbildungen liefern. Scannerdrift und

das durch die offene Bauweise des RKM langsame Verdampfen des Wassers begrenzen die Untersuchungszeit auf 2 bis 4 Stunden.

## 4.5 Wechselwirkung mit Lipidnanopartikeln

In Kapitel 3 wurden Nanopartikel mit dem Raster-Kraft-Mikroskop unter Umgebungsbedingungen an Luft untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Trocknungsprozess die Partikel stark beeinflusst und damit eine Untersuchung von ihnen in Flüssigkeiten wünschenswert ist.

Aber auch in Flüssigkeiten bleiben verschiedene bereits dort dargestellte kritische Aspekte bestehen. Die Suspensionen sind Mischungen verschiedener Stoffe, die durch eine Tensidhülle stabilisiert werden. Durch den Herstellungsprozess entstehen Partikel mit unterschiedlichen Größen. Sollten Wechselwirkungen der Suspensionen mit den Modellmembranen beobachtet werden, könnten von daher verschiedene Ursachen dafür angenommen werden.

Die Abbildung 4.12 zeigt eine Serie von RKM-Abbildungen, welche bei einem Experiment mit Lipidnanopartikeln, einer Suspension mit Partikeln mit einem geringen Anteil bei Raumtemperatur fester lipidartiger Substanzen (NLC), hergestellt wurden. Bei diesem Experiment mit einer präparierten DPPC/POPC Modelloberfläche in Wasser wurde eine verdünnte Suspension von Partikeln während eines Scans hinzugefügt und die Veränderung der Topographie der Modelloberfläche fortlaufend gemessen. Den Ausgangszustand zeigt die Abbildung 4.12a). Während der Abbildung 4.12b) sind 50  $\mu\text{l}$  einer verdünnten Suspension der Partikel dazugegeben worden. Die folgenden Abbildungen (4.12c,e,f)) dokumentieren eine intensive Wechselwirkung mit dem Lipidlayer der Modelloberfläche.

Die fortlaufend gewonnenen Abbildungen zeigen eine starke Modifikation der Topographie des anfangs beobachteten Bilayers. Der anfänglich vorgefundene phasenseparierte Bilayer wird innerhalb der Zeit, die für die 4 aufeinanderfolgenden Abbildungen benötigt wurde (ca. 50 min) vollständig umgebaut. Offensichtlich wird Material aus der Partikelsuspension in den Bilayer eingelagert und damit die Zusammensetzung und infolgedessen die Topographie des Bilayers verändert.

Das Linienprofil 4.12d) zeigt einen Höhenunterschied von ca. 1–1,4 nm, der für das Auftreten einer Gel-Flüssigphasenseparation bei Phosphatidylcholinen beobachtet wird [157, 146]. Das fortwährende Verschwinden der Anteile der Flächen in der Flüssigphase deutet darauf hin, dass Bestandteile der hinzugefügten Suspension sich in die POPC reiche Flüssigphase des Bilayers einlagern und auf diese Weise zur beobachteten Änderung der Morphologie führen. Eine weitere Veränderung der Topographie wurde nicht beobachtet.

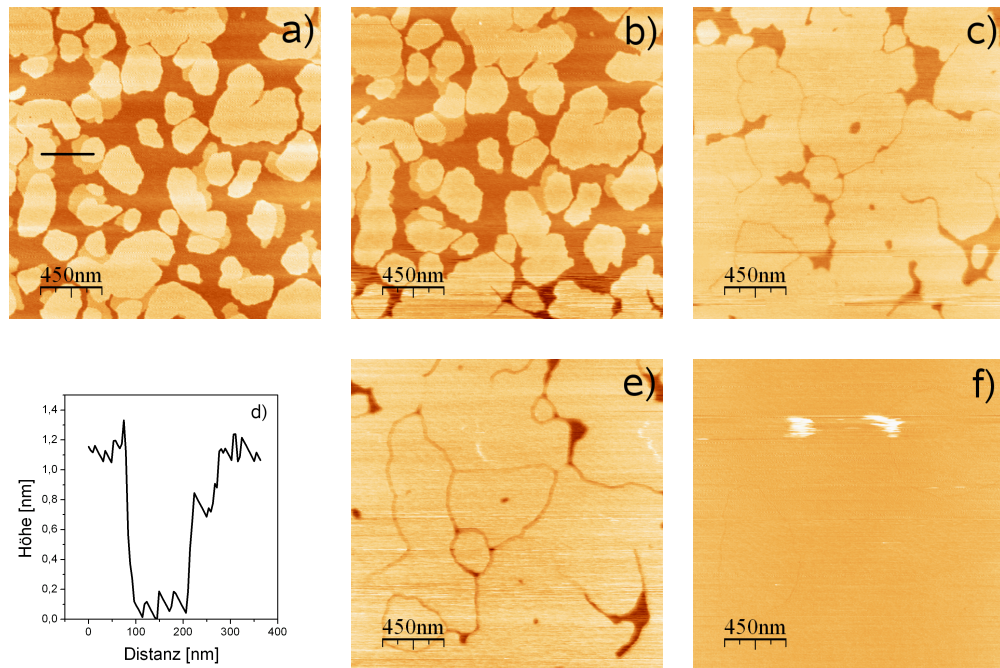


Abbildung 4.12: Eine Serie von RKM-Abbildungen einer DPPC/POPC Lipidmembran, welche einer Lipidpartikelsuspension (NLC) ausgesetzt wird. a) Topographie des Bilayers im Ausgangszustand; b,c und e) zeigen die Veränderungen der Topographie des Bilayers, welche durch die Interaktion der Partikelsuspension mit dem Bilayer hervorgerufen werden über einen Zeitraum von ca. 45 min. f) Nach ca. 90 min ist der gesamte Bilayer umgebaut und der Versuch wurde beendet. Das Linienprofil b) wurde an der Stelle erzeugt, welche durch einen Balken markiert ist. Die Zugabe der Partikelsuspension erfolgte während des Scans für die Abbildung b).

Die erzielten Veränderungen am Modellbilayer können sowohl durch die lipidähnlichen Bestandteile der Partikel, als auch durch die der Suspension beigefügten Tenside hervorgerufen werden. Veränderungen an Phospholipidbilayern durch Tenside sind beobachtet worden [146]. Daher wurde mit einem weiteren Lipidbilayer die Wechselwirkung des Tensids Poloxamer 188 mit der Modellmembran untersucht. Die Abbildungen 4.13 a-d) zeigen ein Experiment, bei dem sukzessive sehr hohe Konzentrationen des Tensids eingesetzt wurden. Sukzessive wurden jeweils 20, 80 bzw. 100  $\mu\text{l}$  der 2,8 %igen Lösung des Tensids hinzugefügt. Anders als im vorangegangenen Experiment mit der Partikelsuspension werden keine signifikanten Veränderungen an der Lipidmembran beobachtet.

Die eingesetzten Tenside sind wahrscheinlich damit nicht die Ursache der



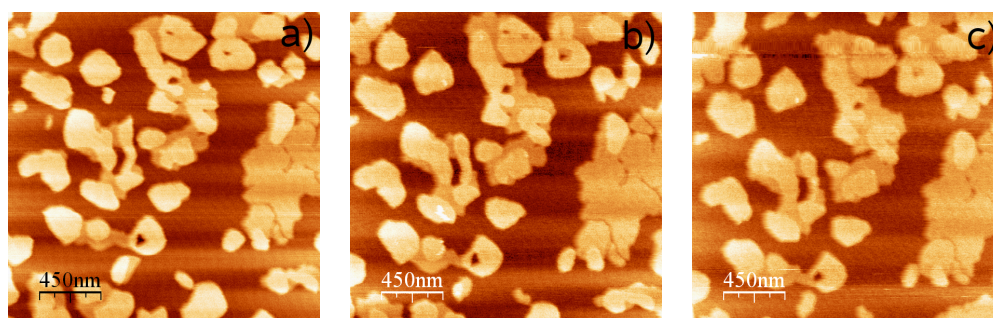


Abbildung 4.13: Sequenz von Topographie-Abbildungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop einer DPPC/POPC Modellmembran, die einer schrittweise erhöhten Konzentration des Tensids Poloxamer 188 bei Raumtemperatur ausgesetzt wird. a) Ausgangssituation; b,c) abgebildete Topographie der Oberfläche nach der Gabe einer Menge des Tensids (sukzessive 20 (vor b)), und 80 + 100  $\mu\text{l}$  vor Bild c). Trotz der hohen Konzentration und der Zeit von über 1 h zwischen der ersten und letzten Abbildung sind keine wesentlichen Veränderungen an dem Bilayer feststellbar.

in der Abbildung 4.12 gezeigten Änderungen der Topographie des Lipidbilayers, womit die lipidartigen Bestandteile der Partikel als Verursacher der Modifikation in Betracht kommen.

Die beiden Bildsequenzen zeigen, dass Lipidpartikelsuspensionen mit planaren Modellmembranen wechselwirken. Im Vorliegenden Fall ist die Wechselwirkung durch die Modifikation der Lipidbilayer in den Abschnitten, welche in der flüssigen Phase vorliegen, sichtbar. Nicht beobachtet wird eine Anlagerung eines Partikels als einzelnes Gebilde. Vielmehr wird ein kontinuierlicher Prozess beobachtet, der einen steten Umbau der Membran herbeiführt. Möglicherweise spielen im beobachteten Fall freie lipidartige Bestandteile, welche in der Partikelsuspension vorkommen, eine Rolle.

## 4.6 Wechselwirkung mit Peptiden

### 4.6.1 Modellpeptide

Peptide kommen in der Natur vor und erfüllen dort eine Reihe von Funktionen im Metabolismus der Lebewesen. Sie sind Verbindungen aus einer kleinen Anzahl von Aminosäuren, was sie von den Proteinen unterscheidet, welche ebenfalls aus diesen Säuren bestehen. Bis zu einem Molekulargewicht von 10000 spricht man von Peptiden oder Polypeptiden und darüber von Proteinen. Insgesamt 23 verschiedene Aminosäuren wurden in den Proteinen und

Peptiden der Lebewesen gefunden. [130]

Es gibt Peptide, welche durch ihre Membranaktivität eine offensive oder defensive Rolle als Waffen der Lebewesen dienen. Sie zeigen antimikrobielle Eigenschaften und können als eine angeborene Immunität betrachtet werden. Peptide sind damit ein vielversprechender Ansatz für Antibiotika und in der Krebsbehandlung. [158] Diese Membranaktivität kann über spezifische Rezeptorwechselwirkungen passieren oder es kann zu einer weniger spezifischen Interaktion mit den Lipidmembranen kommen, infolgedessen die Membrane sich verändern.

Lipidmembrane sind allen Lebewesen gemeinsam, jedoch gibt es deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung dieser Membrane und damit auch in der Interaktion einzelner Peptide mit diesen. An diesem Punkt setzen die von den Lebewesen produzierten peptidbasierten Gifte oder antimikrobiellen Substanzen an.

Es ist möglich Sequenzen von Aminosäuren zu erzeugen, ganz unabhängig davon, ob diese natürlich vorkommen oder nicht. Da die einzelnen Aminosäuren unterschiedliche chemische oder physikalische Eigenschaften besitzen, lassen sich durch die Herstellung unterschiedlicher Sequenzen Peptide mit verschiedenen strukturellen, chemischen und physikalischen Eigenschaften herstellen.

Gegenwärtig gibt es ein Interesse, über Modellpeptide ein Verständnis der Wirkungsweise dieser natürlichen membranaktiven Peptide zu erlangen und letztendlich daraus neue pharmazeutische Wirkstoffe zu gewinnen. An solchen Modellpeptide können unterschiedliche Eigenschaften, wie z.B. die Ladungsverteilung, die räumliche Struktur oder die amphipatischen Eigenschaften, hervorgehoben werden. Damit wird eine gezielte Untersuchung der Wirkungsweise der Peptide möglich.

Eine gezielte Erforschung einzelner herausgestellter Wechselwirkungseigenschaften ist wegen der sehr komplexen Struktur der Zellmembranen und der eher beschränkten exakten Kenntnisse ihrer Eigenschaften an den direkten Zielobjekten, den Zellen, erschwert, weswegen die Untersuchung an Modellmembranen notwendig wird. Verschiedene verfügbare Modellmembrane und Untersuchungsmethoden an ihnen werden dafür benutzt [159, 160, 155, 146, 156], u.a. auch die Raster-Kraft-Mikroskopie an planaren Lipidlayern.

#### **4.6.2 Wirkung der Modellpeptide auf Modellmembrane**

Drei Modellpeptide, MK5e, KLA1 und A2P [155, 156, 161], wurden bei Raster-Kraft-Mikroskop-Abbildungen an den Modellmembranen verwendet. Alle



drei Peptide haben eine durch andere Experimente nachgewiesene Membranwechselwirkung an Phosphatidylcholinmembranen, welche Membrane aus neutralen Lipiden sind. Es wird vermutet, dass bei der Interaktion der Peptide mit ihnen weniger ihre elektrostatischen Wechselwirkungen eine Rolle spielen als vielmehr räumliche Aspekte ihrer Hydrophobizität [158]. MK5e und KLA1 sind amphipatische membranaktive Peptide und das Peptid A2P besitzt weiterhin eine Palmitylkette am N-Terminus, welches eine Verankerung in Lipidbilayer erlaubt. Das vom Apolipoprotein E abgeleitete Peptid war gedacht als Vektor zur Bindung an Endothelzellen, den Zellen der Blut-Hirn-Schranke und soll im Zusammenhang mit einem Drug-Delivery System zur Verbesserung des Arzneistofftransportes in das Zentralnervensystem genutzt werden [161].

Verschiedene Modelle wurden entwickelt, um die beobachteten Membranaktivitäten zu erklären. Abbildungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop sind dahingehend hilfreich, da mit den vermuteten Wechselwirkungsmechanismen auch strukturelle Veränderungen in den Lipidlayern einhergehen. Die entwickelten Modellmembrane bieten günstige Voraussetzungen für eine Untersuchung mit dem RKM, da sie leicht in hoher Qualität herzustellen sind und eine fortlaufende Abbildung den Prozess der Interaktion visualisieren kann.

Die Experimente mit den Peptiden an den Modellmembranen wurden ähnlich wie die Experimente mit den Lipidpartikeln oder dem Tensid gestaltet. Die Modellpeptide wurden durch Dr. M. Dathe (FMP, Berlin) für die Abbildungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop zur Verfügung gestellt.

Planare Modellmembrane für die Abbildung mit dem RKM aus einer anfänglichen Mischung aus gleichen Masseanteilen DPPC und POPC wurden durch Solution Spreading auf Glimmer hergestellt. Alle Messungen sind in Wasser bei Raumtemperatur ausgeführt worden. Die Peptide wurden während eines Scans hinzugefügt, so dass eine optimale zeitliche Verfolgung topographischer Veränderungen an den Proben ermöglicht wurde.

Sequenzen von Topographieabbildungen der Wechselwirkung aller drei Peptide sind in den Abbildungen 4.14, 4.15 und 4.16 dargestellt. In allen Sequenzen wird zunächst der Ausgangszustand abgebildet. Er zeigt einen phasenseparierten Bilayer mit einer DPPC reichen Gelphase und einer POPC reichen flüssigen Phase, welcher in allen 3 Fällen einander ähnliche Strukturen vorweist. In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass diese Bilayer über einige Stunden mit dem Raster-Kraft-Mikroskop ohne signifikante Veränderung der erfassten Morphologie abgebildet werden können.

Jeweils zu einem Zeitpunkt am Beginn der Messung im zweiten Bild wird eine definierte Menge des jeweiligen Peptids zugeführt. Die Konzentration des Peptids war stets höher, als bekannte Konzentrationen, wo hämolytische Effekte an roten Blutkörperchen nachgewiesen wurden [162]. Eine Ausnahme

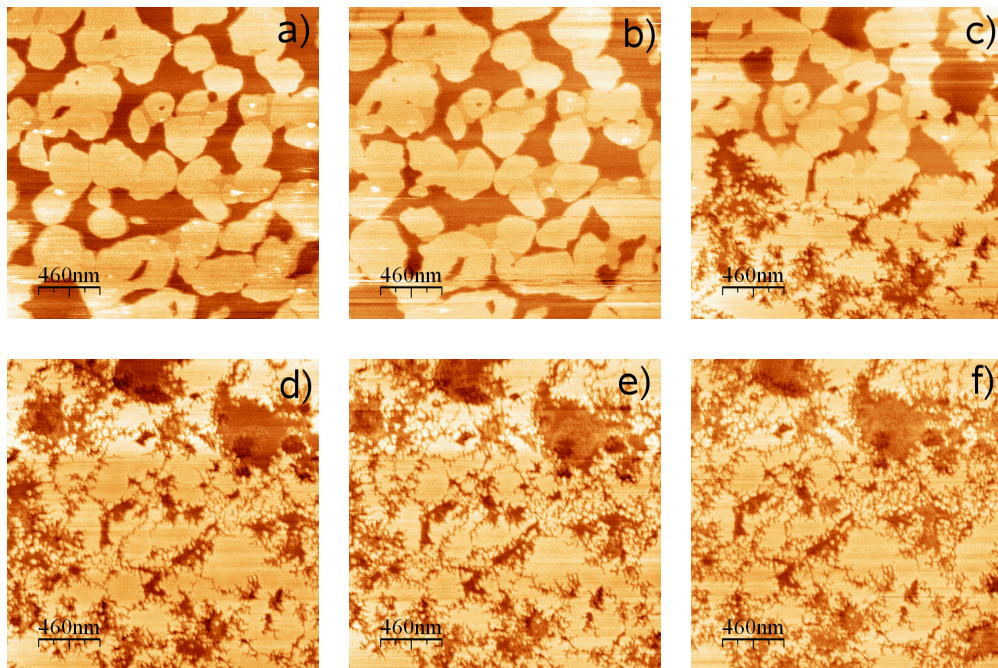


Abbildung 4.14: Sequenz von Topographieabbildungen im MAC-Modus, welche eine Wechselwirkung des Peptids A2P mit einem DPPC/POPC Bilayer in Wasser bei Raumtemperatur darstellen. a) der Bilayer im Ausgangszustand. b-e) Aufeinanderfolgende Abbildung des Bilayers während der Interaktion mit dem Peptid. Die Konzentration des Peptids war  $4 \times 10^{-6}$  M. Jede Abbildung stellt einen Zeitraum von etwa 15 min dar. Das Bild f) zeigt die Topographie des veränderten Bilayers nach etwa 120 min.

hierzu bildet die Abbildung 4.14, bei der in zwei Schritten die Konzentration des Peptids erhöht wurde. Die nachfolgenden Scans verfolgen den zeitlichen Verlauf der Veränderungen der Topographie durch die Interaktion des Lipidbilayers mit den Peptiden.

In allen drei Fällen zeigt sich eine Interaktion zuerst an den POPC reichen Abschnitten des Lipidbilayers, welche sich in der flüssigen Phase befinden. Die sichtbaren Veränderungen der Topographie zeigen, dass es zu einer starken Umordnung des Lipidlayers in diesen Regionen kommt und gleichzeitig Material aus dem Lipidlayer herausgelöst wird. Von dort aus schreitet der Prozess in die DPPC reichen Regionen im Gelzustand fort. Es kommt zu einer sich ausdehnenden Ausfaserung, zu einer Erosion der Randgebiete bis tief in die Region des Gelzustandes.

Bis zum jeweiligen Abbruch der Messungen wird in allen drei Fällen ausgehend vom POPC-reichen flüssigen Anteil des Bilayers der gesamte Bilayer

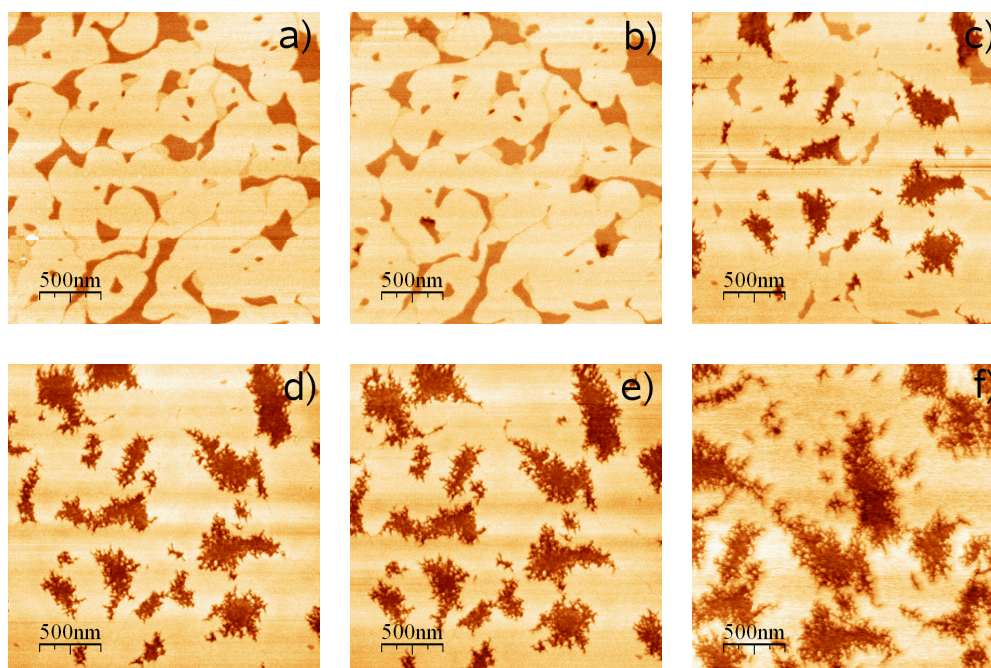


Abbildung 4.15: Sequenz von Topographieabbildungen im MAC-Modus, welche eine Wechselwirkung des Peptids KLA1 mit einem DPPC/POPC Bilayer in Wasser bei Raumtemperatur darstellen. a) der Bilayer im Ausgangszustand. b-e) Aufeinanderfolgende Abbildung des Bilayers während der Interaktion mit dem Peptid. Die Konzentration des Peptids war  $1 \times 10^{-7}$  M. Jede Abbildung stellt einen Zeitraum von etwa 15 min dar. Das Bild f) zeigt die Topographie des veränderten Bilayers nach etwa 120 min.

verändert. Ein Teil der Lipide, möglicherweise jene, welche sich vorher im Wesentlichen in den Regionen im Gelzustand befunden haben, verbleiben auf der Oberfläche. Das Erscheinungsbild für alle 3 Peptide weist Gemeinsamkeiten auf und unterscheidet sich stark vom jeweiligen Ausgangszustand der als Modellmembran gebrauchten Lipidbilayer. Die zum Abschluss vorgefundene Topographie lässt wegen der starken Umordnung keine sichere Aussage darüber zu, in welcher Struktur die verbliebenen Lipide sich angeordnet haben.

Mit dem Peptid A2P wurde ein gleichartiges Experiment mit reinen DPPC Bilayern ausgeführt. Die Abbildung 4.17 zeigt eine Sequenz von Raster-Kraft-Mikroskop-Abbildungen eines DPPC Multilayers, welcher einer hohen Konzentration des Peptids A2P über mehr als 1 h ausgesetzt war. Die Konzentration ist wesentlich höher als sie für das Experiment in Abbildung 4.14 verwendet wurde. Dennoch sind bei Raumtemperatur keine deutlich sichtbaren Veränderungen an dem Multilayer feststellbar.



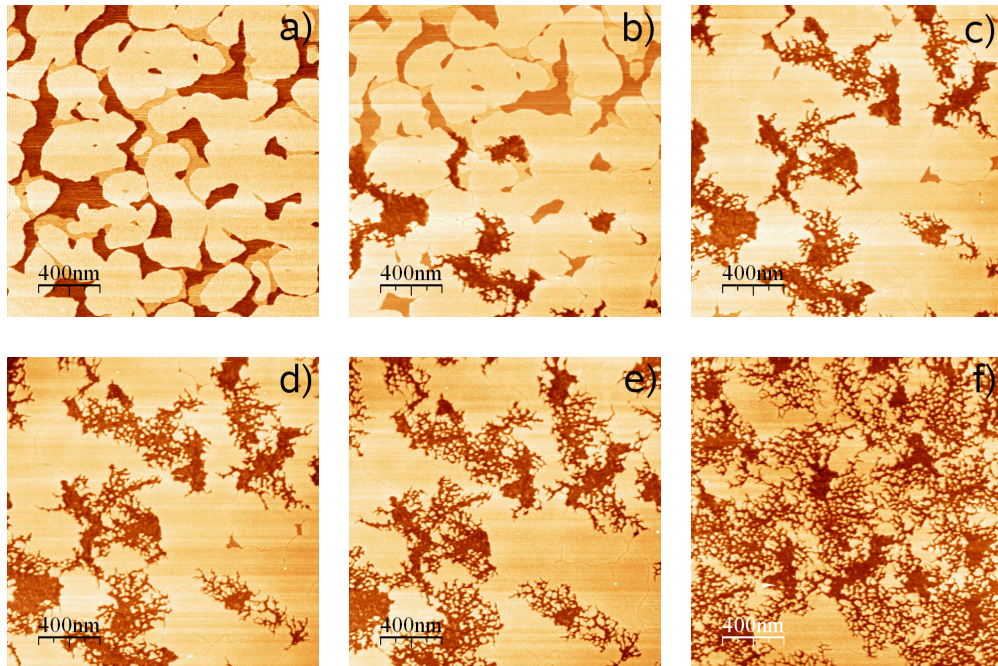


Abbildung 4.16: Sequenz von Topographieabbildungen im MAC-Modus, welche eine Wechselwirkung des Peptids MK5e mit einem DPPC/POPC Bilayer in Wasser bei Raumtemperatur darstellen. a) der Bilayer im Ausgangszustand. b-e) Aufeinanderfolgende Abbildung des Bilayers während der Interaktion mit dem Peptid. Die Konzentration des Peptids war  $1 \times 10^{-6}$  M. Jede Abbildung stellt einen Zeitraum von etwa 15 min dar. Das Bild f) zeigt die Topographie des veränderten Bilayers nach etwa 120 min.

Die Raster-Kraft-Mikroskop-Abbildungen zeigen, dass die Interaktion der verwendeten Petide, welche zu einer erfassbaren Veränderung der Modellmembrane führen, in den Regionen des Bilayers im flüssigen Zustand beginnen. Von den Rändern her werden in Mischsystemen ebenfalls Bereiche im Gelzustand verändert. Reine, sich bei Raumtemperatur im Gelzustand befindliche DPPC-Bilayer, werden nicht einer mit der verwendeten Methode erfassbaren Veränderung unterworfen.

Die Messergebnisse geben die Möglichkeit, ein Modell über einige Aspekte der Wechselwirkungsmechanismen der Modellpeptide mit den Modellmembranen abzuleiten.

Zunächst kann festgestellt werden, dass die verwendeten Peptide selektiv gegenüber dem Phasenzustand und der Zusammensetzung der Modellmembran sind. Modelle für eine Wechselwirkung gleicher oder ähnlicher Peptide mit Phosphatidylcholinmembranen, welche in der Literatur diskutiert wer-

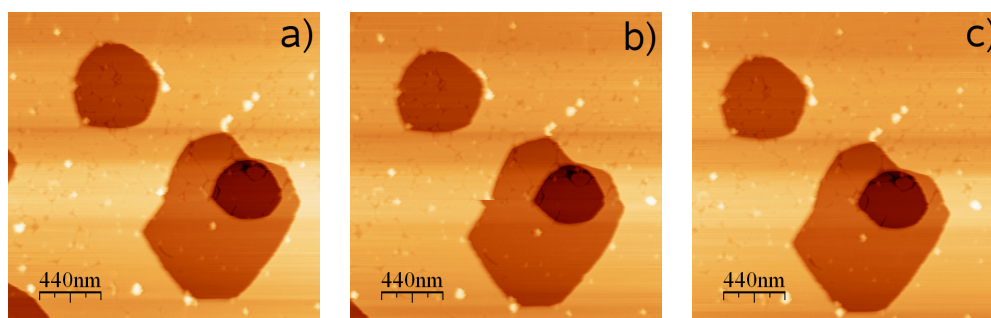


Abbildung 4.17: Sequenz von Topographieabbildungen im MAC-Modus, welche eine Wechselwirkung des Peptids A2P mit einem DPPC Bilayer in Wasser bei Raumtemperatur darstellen. a,b,c) Abbildungen des Bilayers während der Interaktion mit dem Peptid. Trotz der sukzessive erhöhten Konzentration des Peptids, sind keine Veränderungen am Bilayer sichtbar.

den, gehen davon aus, dass ein Peptid in den hydrophoben Teil eines flüssigen Bilayers eindringen kann und es dort zu einer lokalen Umordnung der Bilayerstrukturen kommt. Die Abbildung 4.18a) skizziert diesen Vorgang. An Lipidbilayern aus Phosphatidylcholin (neutrale Lipide) wird dieses dadurch unterstützt, da die hydrophilen Teile des Peptids nicht stark mit den Kopfgruppen der Phosphatidylcholine interagieren und dadurch nicht an den Kopfgruppen lokalisiert werden. Die aus der Interaktion mit den hydrophoben Acylketten resultierende Umordnung kann so stark sein, dass es möglicherweise zu einer Herauslösung von Mizellen, bestehend aus Peptiden und Lipiden, kommen kann. [158, 155, 156, 160, 159]

Die erhaltenen Abbildungen der Raster-Kraft-Mikroskopmessungen zeigen

deutlich, dass die Peptide zunächst im Bereich der POPC reichen flüssigen Anteile der Membran Veränderungen hervorrufen. Zu beobachten ist unmittelbar nach der Zugabe der Modellpeptide eine scheinbare Vergrößerung der Flächen im Gelzustand und danach in der flüssigen Phase beginnend eine Ausbildung von Löchern. Ein Prozess, wie er in der Abbildung 4.18a) skizziert ist, kann durch die Beobachtungen gestützt werden. Bei einer Membran im flüssigen Zustand weisen die einzelnen Lipidmoleküle im Vergleich zu einer Membran im Gelzustand einen größeren Abstand und eine geringere Wechselwirkung untereinander und eine höhere Beweglichkeit auf.

Die kompaktere Anordnung der Lipidmoleküle im Gelzustand verhindert wahrscheinlich ein Eindringen der Peptide in den hydrophoben Teil einer sich im Gelzustand befindlichen Membran, wie es in Abbildung 4.18c) skizziert ist, oder die im Vergleich zu einer Membran im flüssigen Zustand verstärkte

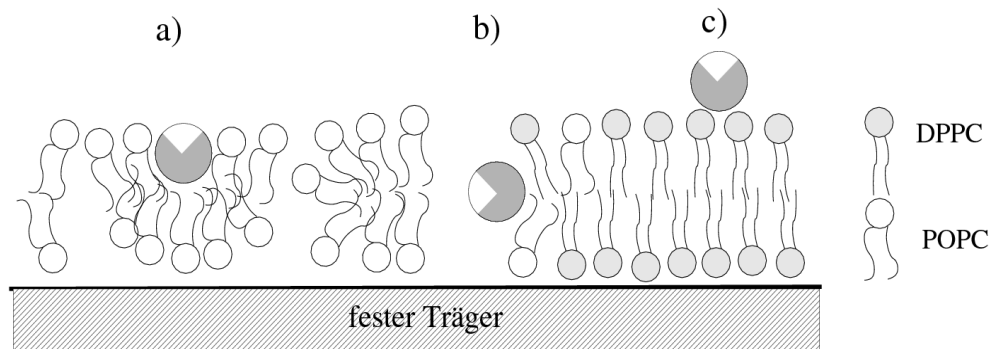


Abbildung 4.18: Ein Schema für die Interaktion der Modellpeptide mit PC-Membrane, welches die in den Experimenten erhaltenen Resultate erklären könnte. a) In Anlehnung an [155] können die Peptide in den PC-Bilayer in Domänen im flüssigen Zustand (POPC reich) eindringen und die Bilayerstruktur lokal stark verändern. b) Ausgehend von solchen Stellen kann eine Wechselwirkung mit den DPPC reichen Regionen im Gelzustand stattfinden. Kleine Domänen von POPC bilden Stellen, an denen die Lipide weniger stark untereinander gebunden sind. c) In Gebieten, die ausschließlich aus DPPC bestehen, bewirken auf der Lipidoberfläche adhärierte Peptide keine starke Störung der Struktur.

Wechselwirkung der Lipidmoleküle untereinander verhindert eine lokale Umordnung der Modellmembran. Eine solche Annahme würde erklären, weshalb reine DPPC Membrane bei Raumtemperatur nicht messbar verändert wurden.

In POPC Mischsystemen hingegen werden DPPC reiche Regionen im Gelzustand ebenfalls von den Peptiden angegriffen. Als Ursache könnte angenommen werden, dass ein Lipidbilayer im Gelzustand eine Anzahl von Molekülen aus POPC enthält und diese eine geringere Stabilität Membran gegenüber den Peptiden verursacht. Weiterhin könnte die Existenz kleiner Domänen von POPC in den Regionen im Gelzustand eine Rolle spielen. Solche Domänen sind in einer Reihe von Mischsystemen verschiedener Lipide beobachtet worden [163, 157, 164, 165]. Außerdem wäre denkbar, dass in den Randbereichen der Phasengrenzen eine spezielle Konformation der Lipide eine Rolle spielt.

Nach einer Interaktion von benachbarten Lipiden im flüssigen Zustand muss sich die Lipidmembran in diesen Bereichen neu organisieren. Die hydrophoben Acylketten der Lipide in den Grenzbereichen können damit direkt mit den hydrophoben Teilen der Modellpeptide wechselwirken. Die vorher diskutierten Aspekte einer dichteren Packung oder einer verstärkten Interaktion

untereinander kommen in den Randbereichen der Regionen im Gelzustand ohnehin weniger stark zum Tragen.

## Simulation der Membranveränderungen

Auf der Grundlage der Annahme eines stark vereinfachten Wechselwirkungsmodells sollen die beobachteten Membranveränderungen mit einem Computermodell untersucht werden. Die Basis des implementierten Modells bildet ein quadratischer Ausschnitt einer sich im Gelzustand befindlichen Membran. In der Mitte des betrachteten Ausschnitts befindet sich anfangs ein Loch, welches durch eine Domäne im flüssigen Zustand gebildet wurde.

Eine solche Startsituation entspricht der Beobachtung, dass eine Interaktion mit den Peptiden zunächst in den Bereichen im flüssigen Zustand stattfindet und es dort offensichtlich durch einen Umbau der Membran zu einer Bildung von Löchern kommt. Die Interaktion von Peptiden mit Membranlipiden im flüssigen Zustand wird in der Literatur diskutiert und kann demnach in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen zu verschiedenen lokalen Veränderungen, auch zur Bildung von Löchern, der Membrane führen.

Bei den durchgeführten Experimenten an den Modellmembranen fällt auf, dass Membrane im Gelzustand in Lipidmischungen aus DPPC und POPC von den Randbereichen her ebenfalls angegriffen und verändert wurden. Die besondere Rolle der Randbereiche für die beobachteten Veränderungen an den Membranen lässt sich ebenfalls durch Simulationen des Abbaus des Lipidlayers erhärten. Die Veränderungen, welche durch die 3 untersuchten Modellpeptide hervorgerufen wurden, scheinen auf einem gemeinsamen Prinzip zu basieren. Dieser Schluss wird durch den Vergleich der zeitlichen Entwicklung der Membranveränderungen getragen, welche in allen 3 Fällen zunächst eine Lochbildung in den flüssigen Bereichen der Membran aufweisen. Von dort ausgehend wird die Membran in einer dendritischen Struktur degradiert. Die Länge der Dendriten und die Größe der dunklen Bereiche in den Abbildungen 4.14, 4.15 und 4.16, welche vermutlich Regionen ohne Membranlipide zeigen, variieren zwischen den Peptiden.

Die dendritische Strukturbildung gibt einen Hinweis auf das Wachstumsmodell der Membranveränderungen und damit auf in der Simulation anzunehmende Wechselwirkungsprinzipien:

- Ein Entfernen einer Zahl von Lipiden vom Rand der Domäne im Gelzustand hinterlässt für eine Zeit einen Bereich, der einer Reorganisation unterworfen ist und in dem Peptide leicht interagieren können.

- Ein Peptid, welches aus der Flüssigkeit an einen solchen Bereich sich anlagert, kann alle in der Nachbarschaft befindlichen Lipide entfernen.
- Peptide haften unterschiedlich stark für eine Zeit auf der Oberfläche einer Domäne im Gelzustand. Sie können ihren Platz tauschen und weisen damit eine Beweglichkeit auf der Oberfläche auf.
- Peptide, welche sich auf der Oberfläche an einen Randbereich bewegen, können dort eine Anzahl (ein oder mehrere) von Lipiden entfernen.

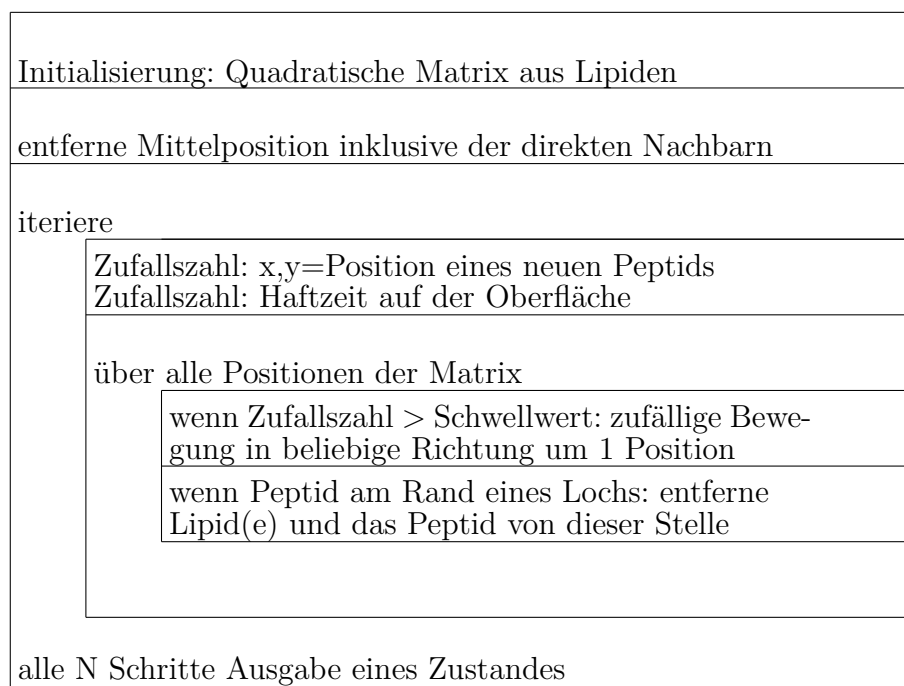


Abbildung 4.19: Logischer Ablauf der Simulation der Wechselwirkung der Peptide mit der Lipidmembran.

In der durchgeführten Simulation wurden die Parameter Beweglichkeit und Dichte der Peptide auf der Oberfläche verändert. Weiterhin wurde untersucht, ob die gemessenen dendritischen Strukturen einen Hinweis auf charakteristische Eigenschaften der lokalen Peptidwechselwirkung geben. Ein schematischer Ablaufplan der Simulation ist in der Abbildung 4.19 dargestellt. Das Programm wurde in einer Hochsprache implementiert und die verschiedenen betrachteten Einflüsse sind durch direkte Modifikation des Quelltextes realisiert worden. Die Abbildung 4.20 zeigt die zeitliche Entwicklung der simulierten Veränderungen um ein Loch herum. Dabei zeigen die Bilder 4.20a-c) das Wachstum eines Loches für den Fall einer sehr geringen Beweglichkeit



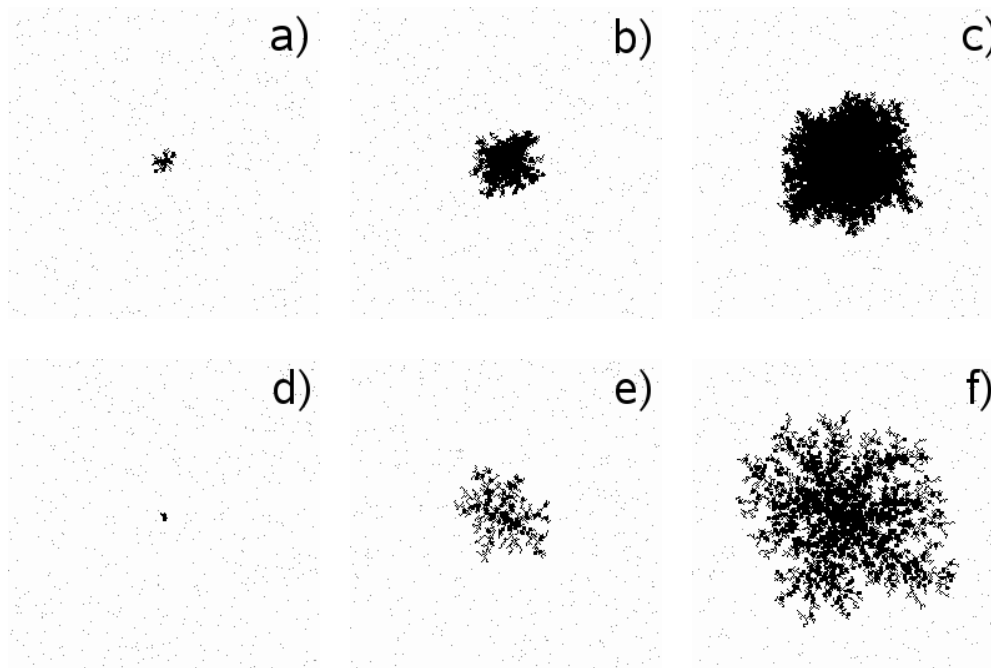


Abbildung 4.20: Simulation der beobachteten Veränderungen an Lipidmembranen in einem vereinfachten Modell. Schwarz steht für Stellen, an welchen die Interaktion mit Peptiden zum Abbau des Lipidlayers (weiß) geführt hat. Auf der Oberfläche anhaftende Peptide sind durch graue Punkte dargestellt. a-c) Charakteristische Sequenz für die Entwicklung eines Loches für den Fall, dass die Peptide nur eine sehr geringe Beweglichkeit auf der Oberfläche besitzen und den Lipidbilayer vom Rand her angreifen. d-f) Für den Fall einer angenommenen höheren Beweglichkeit entsteht ein ausgeprägtes dendritisches Fortschreiten der Degradation des Lipidlayers.

des Peptids auf der Oberfläche. Die Bilder 4.20d-f) stellen den Abbau des Modellbilayers bei Annahme einer hohen Beweglichkeit der Peptide auf dem Lipidlayer dar.

Beide Entwicklungen in Abbildung 4.20 entstanden auf der Annahme der gleichen Wirkungsmechanismen. Unabhängig davon unterscheiden sich die Formen der Bereiche, welche durch die Wirkung der Peptide im Modell abgebaut wurden. Der Parameter Zeit ändert in beiden die Fläche des Gebietes, in dem Lipide abgebaut wurden. Die Beweglichkeit hingegen bestimmt wesentlich die Länge der dendritischen Verästelungen. Eine geringe Beweglichkeit der Peptide im Modell auf der Oberfläche lässt nur kurze Dendriten wachsen und es entsteht ein Loch mit einem nur auf einer kurzen Distanz zerfaserten Rand. Eine hohe Beweglichkeit führt zu ausgeprägtem dendritischem

Fortschreiten des Abbaus der Membran.

Ein Vergleich mit den Messungen zeigt, dass die Situation der Abbildung 4.20a-c) wesentliche Merkmale der zeitlichen Veränderungen der Modellmembran durch das Peptid KLA1 (Abbildung 4.15) widerspiegelt und die Bilder 4.20d-f) wesentliche Merkmale der Membranveränderungen durch das Peptid MK5e (Abbildung 4.16) zeigen. Die Veränderungen an der Membran durch das Peptid A2P sehen ähnlich aus wie die durch das Peptid KLA1 hervorgerufenen Modifikationen. Jedoch wird offensichtlich weniger Material aus dem Bilayer entfernt, so dass weniger ausgedehnte Löcher mit dem RKM zu beobachten sind.

Neben der Beweglichkeit wurde der Einfluss der Dichte der Modellpeptide auf den Abbau der Membran im verwendeten Modell untersucht. Es zeigt sich, dass die Dichte der Peptide auf der Oberfläche die Geschwindigkeit des Abbaus der Membran verändert. Eine höhere Dichte führt zu einer höheren Abbaurrate der Membran. Die charakteristischen Formen des beobachteten Abbaus werden nicht verändert. Eine vergleichbare Abhängigkeit wurde auch bei den RKM-Messungen beobachtet. Messungen aus den betreffenden Versuchen sind jedoch nicht dargestellt.

Als dritter Parameter wurde eine unterschiedliche Effizienz in der lokalen Membranwechselwirkung der Peptide betrachtet. Die in den RKM-Abbildungen verwendeten Peptide besitzen jeweils einen unterschiedlichen Aufbau und wechselwirken daher sicher verschieden an den Membranen. In der Simulation wurde dem durch zwei verschiedene Regeln der Wechselwirkung der sich an einen Rand bewegenden Peptide Rechnung getragen. In beiden Fällen erzeugen auf der Oberfläche bewegliche Peptide dendritische Strukturen, wie die Abbildung 4.21 zeigt. Das linke Bild zeigt eine dendritische Struktur, welche dadurch entstanden ist, dass jeweils 1 Peptid 1 Lipid vom Rand entfernen konnte. Diese Abbauregel wurde im rechten rechten Bild derart verändert, dass 1 Peptid jeweils sämtliche Nachbarlipide entfernen konnte. Neben einer unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeit des Modellbilayers wird auch eine Verbreiterung der dendritischen Kanäle in 4.21b) sichtbar. Die minimal auftretende Breite eines Kanals entspricht in diesem Experiment dem Platz, den die durch ein Peptid entfernten Lipide einnehmen.

Als Schlussfolgerung aus diesem Simulationsexperiment lässt sich aus der (minimale) Breite beobachteter Dendriten ein Rückschluss auf die ungefähre Distanz der durch eine Peptidwechselwirkung lokalen Veränderungen schließen, wenn die Randbereiche der verbliebenen Membran sich nicht wesentlich neu strukturieren. Die beobachteten kleinsten Dendriten bei MK5e (Abbildung 4.16) haben eine gemessene Breite von etwa 10 nm. Nimmt man einen Platzbedarf eines Lipids von ca.  $0,65 \text{ nm}^2$  an (DMPC,  $50^\circ\text{C}$ , [166]), so

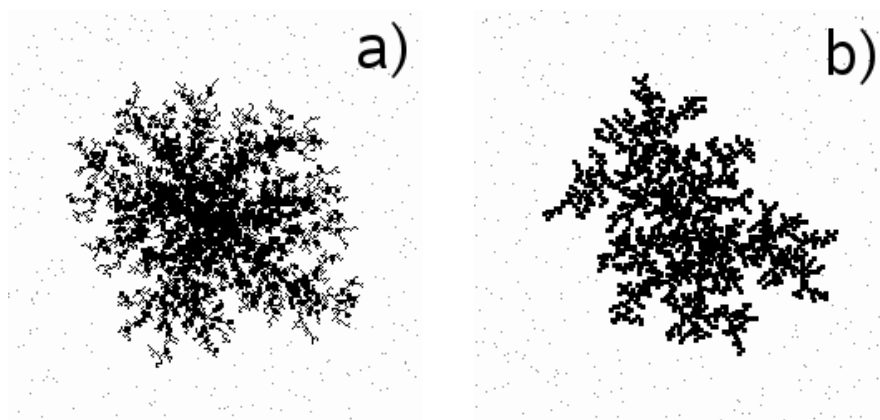


Abbildung 4.21: Simulation der unterschiedlichen lokalen Wirkung zweier beweglicher Modellpeptide auf einen Modellbilayer. a) Abbauzustand wie er durch den Abbau jeweils eines Lipids am Rand entsteht. b) Im Unterschied zum Fall a) konnte das Modellpeptid alle Nachbarlipide abbauen.

liegt Durchmesser einer lokalen Wechselwirkung bei etwa 12 benachbarten Lipiden.

Die durchgeführten Computersimulationen geben Strukturelemente wieder, welche bei der mit dem Raster-Kraft-Mikroskop beobachteten Wechselwirkung der Modellpeptide mit den Membranen entstanden sind. Von daher ergibt sich die Möglichkeit, über die Annahmen im Computermodell Rückschlüsse auf die Wechselwirkung der Modellpeptide mit den Lipidmembranen im Gelzustand zu ziehen.

Die Modellpeptide können an Lipidmembranen aus Lipidmischungen (DPPC/POPC) im Gelzustand von den Rändern her stark Wechselwirken und infolgedessen zu einem Umbau der Membran führen. Der Umbau kann zu einem Herauslösen von Lipiden aus der Membran führen. Weiterhin können die Modellpeptide an die Oberflächen der Lipidmembrane binden. Diese Bindung ist verschieden stark ausgeprägt und führt je nach Peptid zu einer unterschiedlichen Beweglichkeit auf der Oberfläche der Lipidmembran im Gelzustand. Der Parameter Beweglichkeit ist entscheidend für das Entstehen dendritischer Abbauförmungen des Bilayers.

Das verwendete Computermodell führt die beobachteten Membranveränderungen auf eine unterschiedliche Beweglichkeit der Peptide auf der Oberfläche der sich im Gelzustand befindlichen Membran zurück, ohne jedoch die Interaktion der Peptide mit den Lipiden in der vollständigen Dynamik zu erfassen. Das Raster-Kraft-Mikroskop alleine ist nicht in der Lage, die Dynamik des Vorgangs vollständig zu erfassen und bedarf für die Fortsetzung

der Untersuchungen der Ergänzung weiterer Methoden. Die Erkenntnisse über Peptidwechselwirkungen an Membranen sind durch die Anwendung vieler verschiedener Messmethoden wie Kalorimetrie, NMR, FTIR, RKM und komplexen Computersimulationen gewonnen worden [167].

In der Ergänzung mit diesen Methoden wird es wahrscheinlich möglich sein, die hier vorgeschlagene Beweglichkeit der Peptide auf der Lipidmembran weiter zu qualifizieren. Weiterhin kann die Rolle des POPC in den DPPC reichen Regionen im Gelzustand im Zusammenhang mit dem beobachteten unterschiedlichen Abbauverhalten zu reinen DPPC Membranen untersucht werden.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Raster-Kraft-Mikroskopie wurde erfolgreich bei der Untersuchung weicher organischer Oberflächen eingesetzt. Sie ist in der Lage, die Topographie dieser Oberflächen abzubilden und liefert unter geeigneten Bedingungen auch Informationen über lokale strukturelle Unterschiede, welche sich in dynamischen Modi durch einen Phasenkontrast auszeichnen. Der große Vorteil dieser Methode ist es, unter verschiedenen Umgebungsbedingungen Abbildungen zu erzielen, ohne dass die Proben stark auf das Verfahren zugeschnitten werden müssen.

Diese herausragenden Eigenschaften und insbesondere die Möglichkeit der Abbildung in Flüssigkeiten üben eine Attraktivität für die Applikation dieser Methode auf Fragestellungen aus der Biologie oder Pharmazie aus, wo die Untersuchungsobjekte sehr häufig aus organischen Materialien bestehen und die zum Teil nur unter physiologisch nahen Bedingungen existieren.

In dieser Arbeit wurde ein Raster-Kraft-Mikroskop für die Abbildung unter Umgebungsbedingungen an Luft und in Flüssigkeiten zusammengestellt. Die Anwendung dynamischer Modi in beiden Umgebungsbedingungen ermöglichte eine weitgehend schonende Abbildung von weichen organischen Oberflächen. Eine gezielte Wahl von Abbildungsparametern eröffnete den Weg für eine Lithographie auf Polymeren und Glyzeriden (Cetylpalmitat).

Mit diesem Raster-Kraft-Mikroskop wurden Objekte mit pharmazeutischen Hintergrund abgebildet. Die direkte Abbildung von Lipidpartikeln und Zellen erwies sich als möglich, jedoch erforderte die gezielte Untersuchung spezieller Fragestellungen wegen der Vielfalt der erhaltenen topographischen Strukturen die Untersuchung geeigneter Modellsysteme.

Planare auf festen Trägern adhärierte Lipidlayer können als Modellmembrane für Untersuchungen mit dem Raster-Kraft-Mikroskop benutzt werden. Für die Applikation der Mikroskopie in Flüssigkeiten wurde das Verfahren des Solution Spreading adaptiert und die erhaltenen Lipidbilayer hinsichtlich

ihrer Verwendbarkeit als Modellmembrane charakterisiert. Das Verfahren hat gezeigt, dass Membrane aus verschiedenen Phosphatidylcholinen hergestellt werden können, die als Ein- oder Mehrkomponentensystem auch stabil in Wasser oder Pufferlösungen bei Raumtemperatur abgebildet und für weitergehende Experimente verwendet werden können.

Planare Lipidlayer aus DPPC und POPC bieten als Lipidmischsystem einen während der Abbildungszeit auf der Oberfläche stabilen phasenseparierten Film aus Lipiden, welcher durch DPPC reiche Domänen im Gel-Zustand und POPC reiche Domänen im flüssigen Zustand gebildet wird. Lipidmischungen aus diesen Lipiden wurden für die Experimente als Modellsystem einer Zellmembran ausgewählt.

An diesem Modellsystem wurden Untersuchungen mit Lipidnanopartikeln, einem Tensid und Peptiden ausgeführt und deren Einfluss auf die Topographie des beobachteten Ausschnitts der Modelloberfläche im zeitlichen Verlauf ihrer Wechselwirkung mit der Modellmembran untersucht. Mit Hilfe einer Simulation konnten ausgewählte Aspekte der untersuchten Wechselwirkung der Modellpeptide an Phosphatidylcholinmembranen im Gelzustand nachvollzogen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass über Modellansätze das Potenzial der Raster-Kraft-Mikroskopie Beiträge zu Fragestellungen aus diesem Themenkreis liefern kann.

# Literaturverzeichnis

- [1] BINNIG, G. ; QUATE, C.F. ; GERBER, Ch.: Atomic Force Microscope. In: *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986), S. 930–933
- [2] WENDEL, M. ; LORENZ, H. ; KOTTHAUS, J.P.: Sharpened electron beam deposited tips for high resolution atomic force microscope lithography and imaging. In: *Appl. Phys. Lett.* 67 (1995), Nr. 25, S. 3732–3734
- [3] KLEHN, B. ; KUNZE, U.: Nanolithography with an atomic force microscope by means of vector-scan controlled dynamic plowing. In: *J. Appl. Phys.* 85 (1999), Nr. 7, S. 3897–3903
- [4] HEYDE, M. ; RADEMANN, K. ; CAPELLA, B. ; GEUSS, M. ; STURM, H. ; SPANGENBERG, T. ; NIEHUS, H.: Dynamic plowing nanolithography on polymethylmethacrylate using an atomic force microscope. In: *Rev. Sci. Instrum.* 72 (2001), Nr. 1, S. 136–141
- [5] HERTEL, T. ; MARTEL, R. ; AVOURIS, P.: Manipulation of Individual Nanotubes and Their Interaction with Surfaces. In: *J. Phys. Chem. B* 102 (1998), S. 910–915
- [6] KAJIYAMA, T. ; TANAKA, K. ; OHKI, I. ; GE, S.-R. ; YOON, J.-S. ; TAKAHARA, A.: Imaging of Dynamic Viscoelastic Properties of a Phase-Separated Polymer Surface by Forced Oscillation Atomic Force Microscopy. In: *Macromolecules* 27 (1994), S. 7932–7934
- [7] AKARI, S.O. ; VEGTE, E.W. van der ; GRIM, P.C.M. ; BELDER, G.F. ; KOUTSOS, V. ; BRINKE, G. ten ; HADZIIIOANNOU, G.: Imaging of single polymer chains based on their elasticity. In: *Appl. Phys. Lett.* 65 (1994), S. 1915–1917
- [8] BURNHAM, N.A. ; COLTON, R.J.: Measuring the nanomechanical properties and surface forces of materials using an atomic force microscope. In: *J. Vac. Sci. Technol. A* 7 (1989), S. 2906–2913

- [9] MUNZ, M. ; STURM, H. ; SCHULZ, E. ; HINRICHSEN, G.: *The Scanning Force Microscope as a tool for the detection of local mechanical properties within the interphase of fibre reinforced polymers*. 1998
- [10] BURNHAM, N.A. ; GREMAUD, G. ; KULIK, A.J. ; GALLO, P.-J. ; OULEVEY, F.: Materials' properties measurements: Choosing the optimal scanning probe microscope configuration. In: *J. Vac. Sci. Technol. B* 14 (1996), Nr. 2, S. 1308–1312
- [11] FISCHER, P.B. ; WEI, M.S. ; CHOU, S.Y.: Ultrahigh resolution magnetic force microscope tip fabricated using electron beam lithography. In: *J. Vac. Sci. Technol. B* 11 (1993), Nr. 6, S. 2570–2573
- [12] GRÜTTER, P. ; LIU, Y. ; LEBLANC, P. ; DÜRIG, U.: Magnetic dissipation force microscopy. In: *Appl. Phys. Lett.* 71 (1997), Nr. 2, S. 279–281
- [13] DENK, W. ; POHL, D.W.: Local electrical imaged scanning force microscopy. In: *Appl. Phys. Lett.* 59 (1991), Nr. 17, S. 2171–2173
- [14] VATEL, O. ; TANIMOTO, M.: Kelvin probe force microscopy for potential distribution measurement of semiconductor devices. In: *J. Appl. Phys.* 77 (1995), 3, Nr. 6, S. 2358–2362
- [15] JACOBS, H.O. ; KNAPP, H.F. ; STEMMER, A.: Practical aspects of Kelvin probe force microscopy. In: *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999), 3, Nr. 3, S. 1756–1760
- [16] HENNING, A.K. ; HOCHWITZ, T. ; SLINKMAN, J. ; NEVER, J. ; HOFFMANN, S. ; KASZUBA, P. ; DAGHLIAN, C.: Two-dimensional surface dopant profiling in silicon using scanning Kelvin probe microscopy. In: *J. Appl. Phys.* 77 (1995), Nr. 5, S. 1888–1896
- [17] STUART, J.K. ; HLADY, V.: Feasibility of measuring antigen-antibody interaction forces using scanning force microscope. In: *Colloids Surf. B* 17 (1999), S. 37–55
- [18] RAAB, A. ; HAN, W. ; BADT, D. ; SMITH-GILL, S.J. ; LINDSAY, S.M. ; SCHINDLER, H. ; HINTERDORFER, P.: Antibody recognition imaging by force microscopy. In: *Nat. Biotechnol.* 17 (1999), S. 902–905
- [19] ANSELMETTI, D. ; LÜTHI, R. ; MEYER, E. ; RICHMOND, T. ; DREIER, M. ; FROMMER, J.E. ; GÜNTHERODT, H.-J.: Attractive-mode imaging of biological materials with dynamic force microscopy. In: *Nanotechnology* 5 (1994), S. 87–94



- [20] RADEMACHER, M. ; TILLMANN, R.W. ; FRITZ, M. ; GAUB, H.E.: From Molecules to Cells: Imaging Soft Samples with Atomic Force Microscope. In: *Science* 257 (1992), S. 1900–1905
- [21] PUTMAN, C.A.J. ; VAN DER WERF, K.O. ; DE GROOTH, B.G. ; VAN HULST, N.F. ; GREVE, J.: Tapping mode atomic force microscopy in liquid. In: *Appl. Phys. Lett.* 64 (1994), 5, Nr. 18, S. 2454–2456
- [22] BAKER, A.A. ; HELBERT, W. ; SUGIYAMA, J. ; MILES, M.J.: New Insight into Cellulose Structure by Atomic Force Microscopy Shows the  $I_\alpha$  Crystal Phase at Near-Atomic Resolution. In: *Biophys. J.* 79 (2000), S. 1139–1145
- [23] UMEMURA, K. ; ARAKAWA, H. ; IKAI, A.: High Resolution Images of Cell Surface Using a Tapping Mode Atomic Force Microscope. In: *Jpn. J. Appl. Phys. Pt. 2* 32 (1993), S. L1711–L1714
- [24] ENG, L.M. ; BAMMERLIN, M. ; LOPPACHER, Ch. ; GUGGISBERG, M. ; BENNEWITZ, R. ; LÜTHI, R. ; MEYER, E. ; GÜNTHERODT, H.-J.: Surface morphology, chemical contrast, and ferroelectric domains in TGS bulk single crystals differentiated with UHV non-contact force microscopy. In: *Appl. Surf. Sci.* 140 (1999), S. 253–258
- [25] HÖLSCHER, H. ; ALLERS, W. ; SCHWARZ, U.D. ; SCHWARZ, A. ; WIESENDANGER, R.: Interpretation of “true atomic resolution“ images of graphite(0001) in noncontact atomic force microscopy. In: *Physical Review B* 62 (2000), S. 6967–6970
- [26] GIESSIBL, F.J. ; BIELEFELDT, H. ; HEMBACHER, S. ; MANNHART, J.: Imaging of atomic orbitals with the Atomic Force Microscope - experiments and simulations. In: *Ann. Phys. (Leipzig)* 10 (2001), S. 887–910
- [27] GIESSIBL, F.J.: Forces and frequency shifts in atomic-resolution dynamic-force microscopy. In: *Phys. Rev. B* 56 (1997), Nr. 24, S. 16010–16015
- [28] CAPELLA, B. ; BASCHIERI, P. ; FREDIANI, C. ; MICCOLI, P. ; ASCOLI, C.: Improvements in AFM Imaging of the spatial variation of force-distance curves: on-line images. In: *Nanotechnology* 8 (1997), S. 82–87
- [29] WILLEMSSEN, O.H. ; SNEL, M.M.E. ; VAN NOORT, S.J.T. ; VAN DER WERF, K.O. ; DE GROOTH, B.G. ; FIGDOR, C.G. ; GREVE, J.: Optimization of adhesion mode atomic force microscopy resolves individual

- molecules in topography and adhesion. In: *Ultramicroscopy* 80 (1999), S. 133–144
- [30] HAN, W. ; LINDSAY, S.M. ; JING, T.: A magnetically driven probe microscope for operation in liquids. In: *Appl. Phys. Lett* 69 (1996), S. 4111–4113
  - [31] ALBRECHT, T.R. ; GRÜTTER, P. ; HORNE, D. ; RUGAR, D.: Frequency modulation detection using hig-Q cantilevers for enhanced microscope sensitivity. In: *J. Appl. Phys.* 69 (1991), S. 668–673
  - [32] GIESSIBL, F.J.: Atomic Resolution of the Silicon(111)-(7x7) Surface by Atomic Force Microscopy. In: *Science* 267 (1995), S. 68–71
  - [33] HAN, W. ; LINDSAY, S.M.: Probing molecular ordering at a liquid-solid interface with a magnetically oscillated atomic force microscope. In: *Appl. Phys. Lett.* 72 (1998), S. 1656–1658
  - [34] WALTERS, D.A. ; CLEVELAND, J.P. ; THOMSON, N.H. ; HANSMA, P.K. ; WENDMAN, M.A. ; GURLEY, G. ; ELINGS, V.: Short cantilevers for atomic force microscopy. In: *Rev. Sci. Instrum.* 67 (1996), Nr. 10, S. 3583–3590
  - [35] SCHÄFFER, T.E. ; CLEVELAND, J.P. ; OHNESORGE, F. ; WALTERS, D.A. ; HANSMA, P.K.: Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid. In: *J. Appl. Phys.* 80 (1996), Nr. 7, S. 3622–3627
  - [36] CHON, J.W.M. ; MULVANEY, P. ; SADER, J.E.: Experimental validation of theoretical models for the frequency response of atomic force microscope cantilever beams immersed in fluids. In: *J. Appl. Phys.* 87 (2000), 4, Nr. 8, S. 3978–3988
  - [37] HUMPHRIS, A.D.L. ; TAMAYO, J. ; MILES, M.J.: Active Quality Factor Control in Liquids for Force Spectroscopy. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 7891–7894
  - [38] WEIGERT, S. ; DREIER, M. ; HEGNER, M.: Frequency shifts of cantilevers vibrating in various media. In: *Appl. Phys. Lett.* 69 (1996), Nr. 19, S. 2834–2836
  - [39] BATTISON, F.M. ; BAMMERLIN, M. ; LOPPACHER, C. ; LÜTHI, R. ; MEYER, E. ; GÜNTERODT, H.-J. ; EGGIMANN, F.: Fuzzy controlled feedback applied to a combined scanning tunneling and force microscope. In: *Appl. Phys. Lett.* 72 (1998), S. 25–27

- [40] BUTT, H.-J. ; CAPELLA, B. ; KAPPL, M.: Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. In: *Surf. Sci. Rep.* 59 (2005), S. 1–152
- [41] HANSMA, P.K. ; CLEVELAND, J.P. ; RADMACHER, M. ; WALTERS, A.D. ; HILLNER, P.E. ; BEZANILLA, M. ; FRITZ, M. ; VIE, D. ; HANSMA, H.G. ; PRATER, C.B. ; MASSIE, J. ; FUKUNAGA, L. ; MASSIE, J. ; FUKUNAGA, L. ; GURLEY, J. ; ELINGS, V.: Tapping mode atomic force microscopy in liquids. In: *Appl. Phys. Lett.* 64 (1994), 3, Nr. 13, S. 1738–1740
- [42] MAEDA, N. ; SENDEN, T.J. ; MEGLIO, J.-M. di: Micromanipulation of phospholipid bilayers by atomic force microscopy. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1564 (2002), S. 165–172
- [43] BAR, G. ; DELINEAU, L. ; BRANDSCH, R. ; GANTER, M. ; WHANGBO, M.-H.: Hysteresis in the distance-sweep curves of elastomers and its implications in tapping mode atomic force microscopy. In: *Surf. Sci.* 457 (2000), S. L404–L412
- [44] SPATZ, J.P. ; SHEIKO, S. ; MÖLLER, M. ; WINKLER, R.G. ; REINECKER, P. ; MARTI, O.: Forces affecting the substrate in resonant tapping force microscopy. In: *Nanotechnology* 6 (1995), S. 40–44
- [45] XIE, A.F. ; YAMADA, R. ; GEWIRTH, A.A. ; GRANICK, S.: Materials Science of the Gel to Fluid Phase Transition in a Supported Phospholipid Bilayer. In: *Phys. Rev. Lett.* 89 (2002), S. 246103–1
- [46] BURNHAM, N.A.: Apparent and true feature heights in force microscopy. In: *Appl. Phys. Lett.* 63 (1993), S. 114–116
- [47] MARTIN, Y. ; WILLIAMS, C.C. ; WICKRAMASHIGE, H.K.: Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. In: *J. Appl. Phys.* 61 (1987), Nr. 10, S. 4723–4729
- [48] BURNHAM, N.A. ; KULIK, A.J.: *Surface Forces and Adhesion.* to appear in Handbook of Micro/Nanotribology, 12 1997
- [49] HEINZ, W.F. ; HOH, J.H.: Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. In: *Nanotechnology* 17 (1999), S. 143–150
- [50] DONGMO, S. ; TROYON, M. ; VAUTROT, P. ; DELAIN, E. ; BONNET, N.: Blind restoration method of scanning tunneling and atomic force

- microscopy images. In: *J. Vac. Sci. Technol. B* 14 (1996), Nr. 2, S. 1552–1556
- [51] BYKOV, V. ; GOLOGANOV, A. ; SHEVYAKOV, V.: Test structure for SPM tip shape deconvolution. In: *Appl. Phys. A* 66 (1998), S. 499–502
- [52] JAK, M.J.J. ; KONSTAPEL, C. ; KREUNINGEN, A. van ; VERHOEVEN, J. ; GASTEL, R. van ; FRENKEN, J.W.M.: Automated detection of particles, clusters and islands in scanning probe microscopy images. In: *Surf. Sci.* 494 (2001), S. 43
- [53] DONGMO, S. ; VAUTROT, P. ; BONNET, N. ; TROYON, M.: Correction of surface roughness measurements in SPM imaging. In: *Appl. Phys. A* 66 (1998), S. S819–S823
- [54] ANGUIANO, E. ; OLIVA, A.I. ; AGUILAR, M.: Surface texture parameters as a tool to measure image quality in scanning probe microscope. In: *Ultramicroscopy* 77 (1999), S. 195–205
- [55] VILLARUBIA, J.S.: Algorithms for Scanned Probe Microscope Image Simulation, Surface Reconstruction, and Tip Estimation. In: *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* 102 (1997), S. 425–454
- [56] KIELY, J.D. ; BONNELL, D.A.: Quantification of topographic structure by scanning probe microscopy. In: *J. Vac. Sci. Technol. B* 15 (1997), Nr. 4, S. 1483–1493
- [57] ANCZYKOWSKI, B.: *Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur dynamischen Rasterkraftmikroskopie*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Diss., 1998
- [58] MAGONOV, S.N. ; ELINGS, V. ; WHANGBO, M.-H.: Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. In: *Surf. Sci.* 375 (1997), S. L385–L391
- [59] WINKLER, R.G. ; SPATZ, J.P. ; SHEIKO, S. ; MÖLLER, M. ; REINECKER, P. ; MARTI, O.: Imaging material properties by resonant tapping-force microscopy: A model investigation. In: *Phys. Rev. B* 54 (1996), Nr. 12, S. 8908–8912
- [60] CAPPELLA, B. ; DIETLER, G.: Force-distance curves by atomic force microscopy. In: *Surf. Sci. Rep.* 34 (1999), S. 5–104

- [61] HUTTER, J.L. ; BECHHOEFER, J.: Calibration of atomic-force microscope tips. In: *Rev. Sci. Instrum.* 64 (1993), S. 1868–1873
- [62] CLEVELAND, J.P. ; MANNE, S. ; BOCEK, D. ; HANSMA, P.K.: A non-destructive method for determining then spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. In: *Rev. Sci. Instrum.* 64 (1993), Nr. 2, S. 403–405
- [63] SADER, J.E. ; CHON, J.W.M. ; MULVANEY, P.: Calibration of rectangular atomic force cantilevers. In: *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999), 10, Nr. 10, S. 3967–3969
- [64] RENNERT, P. (Hrsg.) ; SCHMIEDEL, H. (Hrsg.) ; WEISSMANTEL, C. (Hrsg.): *Kleine Enzyklopädie Physik*. 1986
- [65] FONTAINE, P. ; GUENOUM, P. ; DAILLANT, J.: A critical look at surface force measurement using a commercial atomic force microscope in the noncontact mode. In: *Rev. Sci. Instrum.* 68 (1997), 11, S. 4145–4151
- [66] STARK, R.W. ; HECKL, W.M.: Fourier transformed atomic force microscopy: tapping mode atomic force microscopy beyond the Hookian approximation. In: *Surf. Sci.* 457 (2000), S. 219–228
- [67] STARK, R.W. ; DROBEK, T. ; HECKL, W.M.: Tapping-mode atomic force microscopy and phase-imaging in higher eignmodes. In: *Appl. Phys. Lett.* 74 (1999), S. 3296–3298
- [68] PIGNATARO, B. ; CHI, L. ; GAO, S. ; ANCZYKOWSKI, B. ; NIEMEYER, C. ; ADLER, M. ; FUCHS, H.: Dynamic scanning force microscopy study of self-assembled DNA-Protein nanostructures. In: *Appl. Phys. A* 74 (2002), S. 447–452
- [69] SULCHEK, T. ; HSIEH, R. ; ADAMS, J.D. ; YARALIOGLU, G.G. ; MINNE, S.C. ; QUATE, C.F. ; CLEVELAND, J.P. ; ATALAR, A. ; ADDERTON, D.M.: High-speed tapping mode imaging with active Q control for atomic force microscopy. In: *Appl. Phys. Lett.* 76 (2000), S. 1473–1475
- [70] MORENO-HERRERO, F. ; PABLO, P.J. de ; COLCHERO, J. ; GÓMEZ-HERRERO, J. ; BARÓ, A.M.: The role of shear forces in scanning force microscopy: a comparison between the jumping mode and tapping mode. In: *Surf. Sci.* 453 (2000), S. 152–158
- [71] CHEN, J. ; WORKMAN, R.K. ; SARID, D. ; HÖPER, R.: Numerical simulations of a scanning force microscope with a large-amplitude vibrating cantilever. In: *Nanotechnology* 5 (1994), S. 199–204

- [72] GLEYZES, P. ; KUO, P.K. ; BOCCARA, A.C.: Bistable behavior of a vibrating tip near a solid surface. In: *Appl. Phys. Lett.* 58 (1991), S. 2989–2991
- [73] KÜHLE, A. ; SØRENSEN, A.H. ; ZANDBERGEN, J.B. ; BOHR, J.: Contrast artifacts in tapping tip atomic force microscopy. In: *Appl. Phys. A* 66 (1998), S. 329–332
- [74] GARCÍA, R. ; SAN PAULO, A.: Attractive and repulsive tip-sample interaction in tapping-mode atomic force microscopy. In: *Phys. Rev. B* 60 (1999), Nr. 7, S. 4961–4967
- [75] BAR, G. ; BRANDSCH, R. ; WHANGBO, M.-H.: Correlation between frequency-sweep hysteresis and phase imaging instability in tapping mode atomic force microscopy. In: *Surf. Sci.* 436 (1999), S. L715–L723
- [76] NOORT, S.J.T. Van ; WERF, K.O. Van der ; GROOTH, B.G. De ; HULST, N.F. Van ; GREVE, J.: Height anomalies in tapping mode atomic force microscopy in air caused by adhesion. In: *Ultramicroscopy* 69 (1997), S. 117–127
- [77] BAR, G. ; BRANDSCH, R. ; WHANGBO, M.-H.: Description of the frequency dependence of the amplitude and phase angle of a silicon cantilever tapping on a silicon substrate by the harmonic approximation. In: *Surf. Sci.* 411 (1998), S. L802–L809
- [78] BAR, G. ; BRANDSCH, R. ; WHANGBO, M.-H.: Effect of tip sharpness on the relative contributions of attractive and repulsive forces in the phase imaging of tapping mode atomic force microscopy. In: *Surf. Sci.* 422 (1999), S. L192–L199
- [79] TAMAYO, J. ; GARCIA, R.: Effects of elastic and inelastic interactions on phase contrast images in tapping-mode scanning force microscopy. In: *Appl. Phys. Lett.* 71 (1997), S. 2394–2396
- [80] BASNAR, B. ; FRIEDBACHER, G. ; BRUNNER, H. ; VALLANT, T. ; MAYER, U. ; HOFFMANN, H.: Analytical evaluation of tapping mode atomic force microscopy for chemical imaging of surfaces. In: *Appl. Surf. Sci.* 171 (2001), S. 213–225
- [81] SCHMITZ, I. ; SCHREINER, M. ; FRIEDBACHER, G. ; GRASSERBAUER, M.: Phase imaging as an extension to tapping mode AFM for then identification of material properties on humidity-sensitive surfaces. In: *Appl. Surf. Sci.* 115 (1997), S. 190–198

- [82] HAUGSTAD, G. ; JONES, R.R.: Mechanisms of dynamic force microscopy on polyvinyl alcohol: region-specific non-contact and intermittent contact regimes. In: *Ultramicroscopy* 76 (1999), S. 77–86
- [83] MOLONI, K. ; BUSS, M. R. ; ANDRES, R. P.: Tapping mode scanning force microscopy in water using a carbon nanotube probe. In: *Ultramicroscopy* 80 (1999), S. 237–246
- [84] LANTZ, M.A. ; O'SHEA, S.J. ; WELLAND, M.E.: Force microscopy imaging in liquids using ac techniques. In: *Appl. Phys. Lett.* 65 (1994), S. 409
- [85] TAKEDA, S. ; NAKAMURA, C. ; MIYAMOTO, C. ; NAKAMURA, N. ; KAGESHIMA, M. ; TOKUMOTO, H. ; MIYAKE, J.: Lithographing of Biomolecules on a Substrate Surface Using an Enzyme-Immobilized AFM TIP. In: *Nano Lett.* 3 (2003), S. 1471–1474
- [86] DAM, T.H. ; PANTANO, P.: Nanotip array photoimprint lithography. In: *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999), 10, Nr. 10, S. 3982–3986
- [87] GARCÍA, R. ; CALLEJA, M. ; ROHRER, H.: Patterning of silicon surfaces with noncontact atomic force microscopy: Field-induced formation of nanometer-size water bridges. In: *J. Appl. Phys.* 1999 (1999), 8, Nr. 86, S. 1898–1903
- [88] NANOTEC, Spanien: *WSxM*. [www.nanotec.es](http://www.nanotec.es), (c)2006
- [89] LINDSAY, S.M. ; LYUBCHENKO, Y.L. ; TAO, N.J. ; LI, Y.Q. ; ODEN, P.I. ; DEROSE, J.A. ; PAN, J.: Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy studies of biomaterials at a liquid-solid interface. In: *J. Vac. Sci. Technol. A* 11 (1993), S. 808–815
- [90] MÜHLEN, A. zur: *Feste Lipid Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation Herstellung, Langzeitstabilität, Charakterisierung, Freisetzungsverhalten und -mechanismen*, Freie Universität Berlin, Diss., 1996
- [91] MÜHLEN, A. zur ; MÜHLEN, E. zur ; NIEHUS, H. ; MEHNERT, W.: Atomic Force Microscopy Studies of Solid Lipid Nanoparticles. In: *Pharm. Res.* 13 (1996), Nr. 9, S. 1411–1416
- [92] DUBES, A. ; PARROT-LOPEZ, H. ; ABDELWAHED, W. ; DEGOBERT, G. ; FESSI, H. ; SHAHGALDIAN, P. ; COLEMAN, A.W.: Scanning electron

- microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. In: *Eur. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics* 55 (2003), S. 279–282
- [93] SHAHGALDIAN, P. ; QUATTROCCHI, L. ; GUALBERT, J. ; COLEMAN, A.W. ; GORELOFF, P.: AFM imaging of calixarene based solid lipid nanoparticles in gel matrices. In: *Eur. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics* 55 (2003), S. 107–113
- [94] LEE, I. ; WANG, X. ; ZHU, C.F. ; WANG, C. ; BAI, C.: Investigation of polystyrene nanoparticles and DNA-protein complexes by AFM with image reconstruction. In: *Appl. Surface Science* 126 (1998), S. 281–286
- [95] GOULD, S.A.C. ; DRAKE, B. ; PRATER, C.B. ; WEISENHORN, A.L. ; MANNE, S. ; HANSMA, H.G. ; HANSMA, P.K. ; MASSIE, J. ; LONGMIRE, M. ; ELINGS, V. ; NORTHERN, B. D. ; MUKERGEE, B. ; PETERSON, C.M. ; STOEKENIUS, W. ; ALBRECHT, T.R. ; QUATE, C.F.: From atoms to integrated circuit chips, blood cells, and bacteria with the atomic force microscope. In: *J. Vac. Sci. Technol. A* 8 (1990), S. 369–373
- [96] LEKKA, M. ; LEKKI, J. ; MARSZALEK, M. ; GOLONKA, P. ; STACHURA, Z. ; CLEFF, B. ; HRYNKIEWCZ, A.Z.: Local elastic properties of cells studied by SFM. In: *Appl. Surf. Sci.* 141 (1999), S. 345–349
- [97] WILLEMSSEN, O.H. ; SNEL, M.M.E. ; CAMBI, A. ; GREVE, J. ; GROOTH, B.G. De ; FIGDOR, C.G.: Biomolecular interactions Measured by Atomic Force Microscopy. In: *Biophys. J* 79 (2000), S. 3267–3281
- [98] DUFRÊNE, Y. ; LEE, G.U.: Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1509 (2000), S. 14–41
- [99] CHAPMAN, D.: Biomembranes and new hemocompatible materials. In: *Langmuir* 9 (1993), S. 39–45
- [100] GRANDBOIS, M. ; CLAUSEN-SCHAUMANN, H. ; GAUB, H.: Atomic Force Microscope Imaging of Phospholipid Bilayer Degradation by Phospholipase A<sub>2</sub>. In: *Biophys. J.* 74 (1998), S. 2398–2404
- [101] TOKUMASU, F. ; JIN, A. ; DVORAK, J.A.: Lipid membrane phase behaviour elucidated in real time by controlled environment atomic force microscopy. In: *J. Electron Microsc.* 51 (2002), S. 1



- [102] BRIAN, A.A. ; MACCONNELL, M.H.: Allogeneic Stimulation of Cytotoxic T Cells by Supported Planar Membranes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984), S. 6159
- [103] TRISTAM-NAGLE, S. ; PETRACHE, H.I. ; SUTER, R.M. ; NAGLE, J.F.: Effect of Substrate Roughness on D Spacing Supports Theoretical Resolution of Vapor Pressure Paradox. In: *Biophys. J.* 74 (1998), S. 1421–1427
- [104] SALDITT, T.: Structure and fluctuations of highly orientated phospholipid membranes. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5 (2000), S. 19–26
- [105] KATSARAS, J.: Adsorbed to a Rigid Substrate, Dimyristoylphosphatidylcholine Multibilayers Attain Full Hydration in All Mesophases. In: *Biophys. J.* 75 (1998), S. 2157–2162
- [106] KUMAR, S. ; HOH, J.H.: Direct Visualization of Vesicle-Bilayer Complexes by Atomic Force Microscopy. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 9963–9940
- [107] WOODWARD, J.T. ; SCHWARTZ, D.K.: In Situ Observation of Self-Assembled Monolayer Growth. In: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996), S. 7861–7862
- [108] WANG, L. ; SONG, Y. ; HAN, X. ; ZHANG, B. ; WANG, E.: Growth of cationic lipid toward bilayer lipid membrane by solution spreading: scanning probe microscopy study. In: *Chem. Phys. Lipids* 123 (2003), S. 177–185
- [109] REVIKINE, I. ; SIMON, A. ; BRISSON, A.: Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the Morphology of Mixed DPPC-DOPS Supported Phospholipid Bilayers. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 1473–1477
- [110] VIÉ, V. ; MAU, N. van ; LESNIEWSKA, E. ; GOUDONNET, J.P. ; HEITZ, F. ; GRIMELLE, C. Le: Distribution of Ganglioside GM1 between Two-Component, Two-Phase Phosphatidylcholine Monolayers. In: *Langmuir* 14 (1998), S. 4574
- [111] LAWRIE, G.A. ; BARNES, G.T. ; GENTLE, I.R.: Self-assembled films of dimyristoylphosphatidylcholine. In: *Colloids Surf. A* 155 (1999), S. 69–84

- [112] POGLITSCH, C.L. ; THOMPSON, N.L.: Interaction of Antibodies with Fc receptors in substrate-supported planar membranes measured by total internal reflection fluorescence microscopy. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 248–254
- [113] MURESAN, A.S. ; LEE, K.Y.C.: Shape Evolution of Lipid Bilayer Patches Adsorbed on Mica: an Atomic Force Microscopy. In: *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), S. 852
- [114] CULLISON, J.K. ; HAWKRIDGE, F.M. ; NAKASHIMA, N. ; YOSHIKAWA, S.: A Study of Cytochrome c Oxidase in Lipid Bilayer Membranes on Electrode Surfaces. In: *Langmuir* 10 (1994), S. 877–882
- [115] SACKMANN, E.: Supported membranes: scientific and practical applications. In: *Science* 43 (1996), S. 271
- [116] MOU, J. ; CZAJKOWSKY, D.M. ; ZHANG, Y. ; SHAO, Z.: High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix. In: *FEBS Lett.* 371 (1995), S. 279–282
- [117] *Kapitel* Confirmations of fluid lipid membranes. In: KLÖSGEN, B.: *Lipid bilayers: structure, fluctuation and interaction*. Springer, New York, Berlin, 2000, S. 47–88
- [118] NAGLE, J.F. ; TRISTAM-NAGLE, S.: Structure of lipid bilayers. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1469 (2000), S. 159–195
- [119] STRYER, L.: *Biochemistry*. Internat. student ed. 3. New York : Freeman, 1988
- [120] LUZZATI, V. ; GAMBACORTA, A. ; DEROSA, M. ; GULIK, A.: Polar Lipids of Thermophilic Procaryotic Organisms: Chemical and Physical Structure. In: *Annu. Rev. Biophys. Biophysical Chem.* 16 (1987), S. 25–47
- [121] KRUIJFF, B. de: Polymorphic regulation of membrane lipid composition. In: *Nature* 329 (1987), S. 587
- [122] *Kapitel* 8. In: HEIMBURG, T.: *Planar Lipid Bilayer (BLMs) and their Applications*. Amsterdam : Elsevier, 2003, S. 269
- [123] HUANG, C. ; LI, S.: Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1422 (1999), S. 273

- [124] PFEIFFER, H. ; WINTER, R. ; KLOSE, G. ; HEREMANS, K.: Thermo-tropic and pizotropic phase behaviour of phospholipids in propanediols and water. In: *Chem. Phys. Lett.* 371 (2003), S. 670–674
- [125] *Kapitel Aligned Lipid-Water-Systems in Lipid Bilayers: Structure and Interactions.* In: KATSARAS, J. ; RAGHUNATHAN, V.A.: *Lipid Bilayers - Structure and Interactions.* Springer, 2001, S. 25–45
- [126] CZAJKOWSKY, D.M. ; HUANG, C. ; SHAO, Z.: Ripple Phase in Asym-metric Unilammellar Bilayers with Saturated and Unsaturated Phos-pholipids. In: *Biochemistry* 34 (1995), S. 12501–12505
- [127] KAASGAARD, T. ; LEIDY, C. ; CROWE, J.H. ; MOURITSEN, O.G. ; JØRGENSEN, K.: Temperature-Controlled Structure and Kinetics of Ripple Phases in One- and Two-Component Supported Lipid Bilayers. In: *Biophys. J.* 85 (2003), S. 350–360
- [128] SENGUPTA, K. ; RAGHUNATHAN, V.A. ; KATSARAS, J.: Structure of the ripple phase in chiral and racemic dimyristoylphosphatidylcholine multilayers. In: *Phys. Rev. E* 59 (1999), S. 2455–2457
- [129] CULLIS, P.R. ; HOPE, M.J. ; TILCOCK, C.P.S.: Lipid Polymorphism and the Roles of Lipids in Membranes. In: *Chem. Phys. Lipids* 40 (1986), S. 127
- [130] MORRISON, R.T. ; BOYD, R.N.: *Organic Chemistry.* Prentice-Hall, Inc., 1992
- [131] YARROW, F. ; VLUGT, T.J.H. ; EERDEN, J.P.J.M. van der ; SNEL, M.M.E.: Melting of a DPPC lipid bilayer observed with atomic force microscopy and computer simulation. In: *J. Cryst. Growth* 275 (2005), S. e1417–e1421
- [132] CAFFREY, M. ; HOGAN, J.: LIPIDAT: a database of lipid phase transi-tion temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis. In: *Chem. Phys. Lipids* 61 (1992), S. 1
- [133] TOKUMASU, F. ; JIN, A. ; FEIGENSON, G.W. ; DVORAK, J.A.: Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. In: *Ultramicroscopy* 97 (2003), S. 217
- [134] SEUL, M.: Distinct States of Hydration in Thin Lyotropic Multilayers. In: *Phys. Rev. Lett.* 60 (1988), S. 1150–1153

- [135] SEUL, M. ; EISENBERGER, P.: X-ray scattering study of water intercalation into thin lyotropic multilayers. II. Transitions between pure states of hydration via disordered intermediate states. In: *Physical Review A* 39 (1989), S. 4242–4253
- [136] SCHNEIDER, J. ; BARGER, W. ; LEE, G.U.: Nanometer Scale Surface Properties of Supported Lipid Bilayers Measured with Hydrophobic and Hydrophilic Atomic Force Microscope Probes. In: *Langmuir* 19 (2003), S. 1899
- [137] TAGUCHI, S. ; WAKAYAMA, N.: Atomic Force Microscopy Observation of the Phase Separation in Acidic Phospholipid/Neutral Phospholipid Supported Bilayers. In: *Jpn. J. Appl. Phys.* 41 (2002), S. 4987–4989
- [138] MESQUITA, R.M.R.S. ; MELO, E. ; THOMPSON, T.E. ; VAZ, W.L.C.: Partitioning of Amphiphiles between Coexisting Ordered and Disordered Phases in Two-Phase Lipid Bilayer Membranes. In: *Biophys. J* 78 (2000), S. 3019–3025
- [139] RATTO, T.V. ; LONGO, M.L.: Obstructed Diffusion in Phase-Separated Supported Bilayers: A Combined Atomic Force Microscopy and Fluorescence Recovery after Photobleaching Approach. In: *Biophys. J.* 83 (2002), S. 3380–3392
- [140] OUDENAARDEN, A. van ; BOXER, S.G.: Brownian Ratchets: Molecular Separations in Lipid Bilayers Supported on Patterned Arrays. In: *Science* 19 (1999), S. 1046
- [141] WANG, L. ; XIN-PU, H. ; OTTOVA, A. ; TIEN, H.T.: Receptor-ligand interactions in a reconstituted bilayer lipid membrane. In: *Electrochem. Comm.* 2 (2000), S. 287
- [142] FANG, Y. ; YANG, J.: The growth of bilayer defects and the induction of interdigitated domains in the lipid-loss process of supported phospholipid bilayers. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1324 (1997), S. 309–319
- [143] ANDERSON, R.G.W. ; JACOBSON, K.: A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. In: *Science* 296 (2002), S. 1821–1825
- [144] TIEN, H.T. ; SALAMON, Z.: Self-assembling bilayer lipid membranes on solid support. In: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12 (1990), S. 478

- [145] BLODGETT, K.A. ; LANGMUIR, I.: Built-up Films of Barium Stearate and their Optical Properties. In: *Phys. Rev.* 51 (1937), S. 964
- [146] RINIA, H.A. ; KRUIJFF, B. de: Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. In: *FEBS letters* 504 (2001), S. 194–199
- [147] RINIA, H.A. ; KIK, R.A. ; DEMEL, R.A. ; KILLIAN, M.E.E. S. ; EERDEN, J.P.J.M. van der ; KRUIJFF, Ben de: Visualization of Highly Ordered Striated Domains Induced by Transmembrane Peptides in Supported Phosphatidylcholine Bilayers. In: *Biochemistry* 39 (2000), S. 5852–5858
- [148] SEUL, M. ; SAMMON, M.J.: Preparation of surfactant multilayer films on solid substrates by deposition from organic solution. In: *Thin Solid Films* 185 (1990), S. 287–305
- [149] SPANGENBERG, T. ; MELLO, N. F. de ; CRECZYNSKI-PASA, T. B. ; PASA, A. A. ; NIEHUS, H.: AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by solution spreading. In: *physica status solidi a* 201 (2004), S. 857–860
- [150] LOOS, J.: The Art of SPM: Scanning Probe Microscopy in Materials Science. In: *Advanced Materials* 17 (2005), S. 1821–1833
- [151] VOGEL, M. ; MÜNSTER, C. ; FRENZL, W. ; SALDITT, T.: Thermal Unbinding of Highly Orientated Phospholipid Membranes. In: *Phys. Rev. Lett.* 84 (2000), S. 390–393
- [152] PERINO-GALLICE, L. ; FRAGNETO, G. ; MENNIKE, U. ; SALDITT, T. ; RIEUTORD, F.: Dewetting of solid-supported multilamellar lipid layers. In: *Eur. Phys. J. E* 8 (2002), S. 275–282
- [153] MCNEIL, L.E. ; GRIMSDITCH, M.: Elastic moduli of muscovite mica. In: *J. Phys.: Condens. Matter* 5 (1993), S. 1681–1690
- [154] NAGLE, J.F. ; KATSARAS, J.: Absence of a vestigial vapor pressure paradox. In: *Phys. Rev. E* 59 (1999), S. 7018
- [155] DATHE, M. ; MEYER, J. ; BEYERMANN, M. ; MAUL, B. ; HOISCHEN, C. ; BIENERT, M.: General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1558 (2002), S. 171–186

- [156] DATHE, M. ; NIKOLENKO, H. ; MEYER, J. ; BEYERMANN, M. ; BIERNERT, M.: Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charges. In: *FEBS Letters* 501 (2001), S. 146–150
- [157] TOKUMASU, F. ; JIN, A.J. ; FEIGENSON, G.W. ; DVORAK, J.A.: Nanoscopic Lipid Domain Dynamics Revealed by Atomic Force Microscopy. In: *Biophys. J* 84 (2003), S. 2609–2618
- [158] *Kapitel Antibacterial and Hemolytic Activity of Amphipathic Helical Peptides.* In: DATHE, M.: *Membrane Structure in Disease and Drug Therapy.* Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 2000, S. 1–26
- [159] MÜNSTER, C. ; LU, J. ; SCHINZEL, S. ; BECHINGER, B. ; SALDITT, T.: Grazing incidence X-ray diffraction of highly aligned phospholipid membranes containing the antimicrobial peptide magainin 2. In: *Eur Biophys J* 28 (2000), S. 683–688
- [160] MÜNSTER, C. ; SPAAR, A. ; BECHINGER, B. ; SALDITT, T.: Magainin 2 in phospholipid bilayers: peptide orientation and lipid chain ordering studied by X-ray diffraction. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1562 (2002), S. 37–44
- [161] SAUER, I.: *Apolipoprotein E-abgeleitete Peptide als Vektoren zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke*, FU Berlin, Diss., 2004
- [162] Datenblatt zur Substanzübergabe (1.12.2003)
- [163] MELLO, N.F. de: *Bicamadas Lipídicas em suportes sólidos: Preparação e caracterização por microscopia de força atômica (AFM)*, UFSC Florianópolis, Diplomarbeit, 2003
- [164] VALDRÈ, G. ; ALESSANDRINI, A. ; MUSCATELLO, U. ; VALDRÈ, U. ; VANNINI, V.: Coexistence of nanoscopic domains in synthetic membranes. In: *Philos. Mag. B* 79 (1999), S. 1549–1559
- [165] MUSCATELLO, U. ; ALESSANDRINI, A. ; VALDRÈ, G. ; VANNINI, V. ; VALDRÈ, U.: Lipid Oxidation Deletes the Nanodomain organization of Artificial Membranes. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270 (2000), S. 448–452
- [166] NAGLE, J.F. ; ZHANG, R. ; TRISTAM-NAGLE, S. ; SUN, W. ; PETRACHE, H.I. ; SUTER, R.M.: X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. In: *Biophys. J.* 70 (1996), S. 1419–1431

- [167] SANDERSON, J.M.: Peptide–lipid interactions: insights and perspectives. In: *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005), S. 201–212

# Symbole und Definitionen

$A$	Amplitude
AFM	<u>a</u> tomic <u>f</u> orce <u>m</u> icroscope
A2P	Modellpeptid [161]
$b$	Eindrucktiefe in die Probe
$d$	Auslenkung des Federbalkens
$D$	Abstand Spitze–Probenoberfläche
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSP	<u>d</u> igital <u>s</u> ignal <u>p</u> rocessor
$E$	Energie, unspezifisch; Elastizitätsmodul
$E_{kin}$	kinetische Energie
$E_{pot}$	potentielle Energie
$f$	Frequenz
$f_0$	Eigenfrequenz des Federbalkens
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
$i$	Index, Summierungsindex
KLA1	Modellpeptid [155]
$k_c$	Federkonstante des Federbalkens
$k_p$	modellbezogene Federkonstante der Probe
$L_\alpha$	flüssig-kristalline Phase
$L_\beta$	Gel-Phase
$m^*$	effektive Masse des Federbalkens
MK5e	Modellpeptid [156]
NLC	Lipidnanopartikel
PC	Phosphatidylcholine aus dem Hühnerei
PID	Abk. für <u>P</u> roportional- <u>I</u> ntegral- <u>D</u> ifferential-Regler
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin
$Q$	Güte des Schwingkreises/des Oszillators
REM	<u>R</u> aster <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskop
RKM	Raster-Kraft-Mikroskop



SLN	Solid Lipid Nanoparticle
$t$	Zeit
$T_m$	Hauptphasenübergangstemperatur
TM-AFM	Tapping mode RKM
WSxM	Messprogramm, <a href="http://www.nanotec.es">www.nanotec.es</a>
$x$	Richtungsordinate, i.a. probenbezogen
$y$	Richtungsordinate, i.a. probenbezogen
$z$	Richtungsordinate, i.a. auf Bewegung der Spitze bezogen
$z_0$	Koordinatenursprung
$z_c$	Koordinate des Federbalkens
$z_p$	Koordinate der Probenoberfläche
$\beta_c$	Dämpfungskonstante des Federbalkens
$\beta_p$	modellbezogene Dämpfungskonstante der Probe
$\phi$	Phase
$\omega$	$\omega = 2\pi f$
$\omega_0$	$\omega_0 = 2\pi f_0$ , Eigenfrequenz
$\omega_r$	$\omega_r = 2\pi f_r$ , Resonanzfrequenz

# Danksagung

Eine solche Arbeit wird nicht allein in einer stillen Kammer vollbracht. Ich möchte mich an erster Stelle bei meiner ganzen Familie und insbesondere bei meiner Frau Nildete für das entgegengebrachte Verständnis und die Unterstützung während der langen Zeit bedanken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, mich bei Herrn Prof. Horst Niehus für die entgegenbrachte Unterstützung, die vielen Ratschläge und konstruktiven Diskussionen zu bedanken. Danken möchte ich ebenso der gesamten Arbeitsgruppe und hier insbesondere Ralf-Peter Blum, Karin Braune und Günter Lindenberg für die Hilfe bei den täglichen Arbeiten, den wertvollen Hinweisen bei Problemlösungen und das angenehme Arbeitsumfeld; Herrn Dr. S. Rogaschewski und Frau G. Domes für die Anfertigung vieler Rasterelektronenmikroskopaufnahmen und der Elektronikwerkstatt und Werkstatt des Institutes für Physik der HU-Berlin.

Nicht vergessen möchte ich die Kooperationspartner aus der Forschergruppe, welche viele der untersuchten Substanzen und Materialien zur Verfügung gestellt haben. Ganz besonders sind dies Dr. W. Mehnert und Arbeitsgruppe, sowie Fr. Prof. Schäfer-Korting und Arbeitsgruppe von der Pharmazie an der FU Berlin und Dr. M. Dathe und Arbeitsgruppe vom FMP Berlin Buch.

Danken möchte ich ebenfalls Prof. André Avelino Pasa und Prof. Tânia Creczynski-Pasa, UFSC Florianópolis, für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe in Florianópolis (Brasilien).

# Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt zu haben und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.